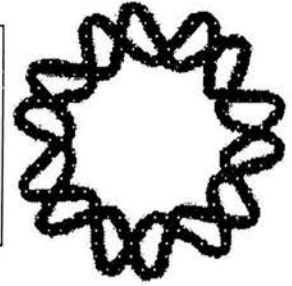


00591



Instituto de Biotecnología

Universidad Nacional Autónoma de México



**“Ingeniería metabólica y evolución dirigida de
proteínas aplicadas a la producción de fenilalanina
en *Escherichia coli*”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA

M. en C. José Luis Báez Viveros

Cuernavaca, Mor. agosto de 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Indice general. Pág. i

Indice de figuras. Pág. iv

Indice de tablas. Pág. v

Nomeclatura. Pág. v

1. **RESUMEN.** Pág. 1

ABSTRACT. Pág. 4

2. **INTRODUCCIÓN.** Pág. 7

La esencia de la Ingeniería Metabólica. Pág 7

3. **ANTECEDENTES.** Pág. 9

**3.1 LOS AMINOACIDOS AROMATICOS Y SUS COMPUESTOS
DERIVADOS.** Pág. 9

3.1.1. Importancia de los aminoácidos aromáticos y compuestos
derivados. Pág. 9

3.1.2 Producción de DHS y ácido adípico. Pág 11

3.1.3 Producción de L-Phe, precursor de aspartamo y de
2-feniletanol. Pág 12

3.1.4 Síntesis de aminoácidos aromáticos: métodos químicos *versus*
bioquímicos. Pág 14

3.2 ANALISIS DE VIAS METABOLICAS EN *Escherichia coli*. Pág 14

3.2.1 El Sistema de Transporte Fosfotransferasa (PTS) y el
metabolismo central de carbono . Pág 14

3.2.2 Estructura de la vía del Shiquimato. Pág 18

3-Desoxi-D-*Arabino*-Heptulose 7-Fosfato Sintasa. Pág 19

3.2.3 Vía de síntesis de fenilalanina. Pag. 22

Corismato mutasa/prefenato deshidratasa. Pag. 22

3.3 RENDIMIENTOS Y PRODUCTIVIDADES. Pág. 23

3.4 INGENIERIA DEL METABOLISMO CENTRAL DE CARBONO.
Pág. 26

- 3.4.1 **Incremento en la disponibilidad de eritrosa 4-fosfato (E4P).** Pág. 26
 - 3.4.1.1 Sobreexpresión de transcetolasa (*tktA*) y transaldolasa (*tal*). Pág. 26
 - 3.4.1.2 Empleo de azúcares no-PTS. Pág. 26
- 3.4.2 **Incremento en la disponibilidad de fosfoenolpiruvato (PEP).** Pág. 27
 - 3.4.2.1 Inactivación de las piruvato cinasas (*pykA*, *pykF*) Pág. 29
 - 3.4.2.2 Inactivación de PEP carboxilasa (*ppc*). Pág. 29
 - 3.4.2.3 Inactivación del PTS (*ptsHI*, *crr*). Pág. 30
 - 3.4.2.4 Sobreexpresión de PEP sintasa (*pps*) Pág. 31
- 3.5 **EVOLUCION DIRIGIDA DE PROTEINAS.** Pág. 32
 - 3.5.1 **Importancia en la generación de las mutantes fbr en Ingeniería Metabólica.** Pág. 32
 - 3.5.2 **Recombinación homóloga *in vitro* (“DNA shuffling”).** Pág. 32
- 3.6 **EJEMPLOS DE TRABAJOS DE INGENIERIA METABOLICA ENFOCADOS A LA PRODUCCION DE COMPUESTOS AROMATICOS SINTETIZADOS A PARTIR DE GLUCOSA. .** Pág. 33
 - 3.6.1 **Intermediarios de la vía del shiquimato.** Pág. 33
 - 3.6.2 **Fenilalanina.** Pág. 34
- 4. **OBJETIVOS.**
 - 4.1 **Objetivo general.** Pág 37
 - 4.2 **Objetivos específicos.** Pág 37
- 5. **MATERIALES Y METODOS**
 - 5.1 **PLASMIDOS.** Pág 39
 - 5.1.1 Construcción del plásmido pJLBaroGfbr. Pág 39
 - 5.1.2 Construcción de los plásmidos pTrcpheA^{fbr}, pTrcpheA^{ev1} y pTrcpheA^{ev2}. Pág 40
 - 5.2 **CEPAS.** Pág 43
 - Construcción de las cepas de *Escherichia coli* modificadas por Ingeniería Genética e Ingeniería de Proteínas. Pág 43

- 5.3 **Medios de cultivo.** Pág 44
 - 5.3.1 Medio mínimo M9 modificado. Pág 44
 - 5.3.2 Medio ARO. Pág 45
- 5.4 **Condiciones de cultivo** Pág 45
- 5.5 **Métodos analíticos** Pág 47

- 6. **RESULTADOS Y DISCUSION.** Pág 48
 - 6.1 **Sistema de cultivo de células en reposo “resting cells”.** Pág 48
 - 6.2 **Acumulación de intermediarios aromáticos.** Pág 52
 - 6.3 **Productividades de L-Fenilalanina.** Pág. 56
 - 6.4 **Rendimientos.** Pág. 61
 - 6.5 **Redistribución de flujos metabólicos en el nodo PEP.** Pág 65

- 7. **CONCLUSIONES.** Pág 70
- 8. **PERSPECTIVAS.** Pág. 72
- 9. **REFERENCIAS.** Pág 75

Índice de figuras

Figura	Descripción
1	Compuestos de importancia industrial derivados la vía común de aminoácidos aromáticos. Pág. 10.
2	Componentes del Sistema de Transporte Fosfotransferasa (PTS). Pág 15.
3	Red metabólica relacionada a la biosíntesis de L-Phe en <i>E. coli</i> . Pág 17.
4	Circuito regulatorio de la vía común de síntesis de aminoácidos aromáticos y vías terminales de Phe, Tyr y Trp. Pág 20.
5	Distribución de flujos carbono alrededor del nodo PEP en cepas silvestres y mutantes PTS. Pág 28.
6	Esquema de construcción de las versiones insensibles a retroinhibición del gene <i>pheA</i> (<i>pheA^{fbr}</i> , <i>pheA^{ev1}</i> , <i>pheA^{ev2}</i>). Pág 42.
7	Concentración celular (g/l) de los cultivos en reposo ó “resting cells”. Pág 51.
8	Cinética de consumo volumétrico de glucosa, reportada como g/l. Pág 51.
9	Promedio de las velocidades específicas de consumo de glucosa (q_{Glc}) a lo largo de los cultivos reportadas en g/g-peso-seco· h. Pág 51.
10	Cinética de producción de DHS en cepas PTS ⁺ y mutantes PTS ⁻ Glc ⁺ , expresando diferentes versiones de la enzima CM-PDT. Pág 55.
11	Cinética de producción de SHIK en cepas PTS ⁺ y mutantes PTS ⁻ Glc ⁺ , expresando diferentes versiones de la enzima CM-PDT. Pág 55.
12	Cinética de producción de CHO en cepas PTS ⁺ y mutantes PTS ⁻ Glc ⁺ . Pág 55.
13	Cinética de producción de L-Phe en cepas PTS ⁺ y mutantes PTS ⁻ Glc ⁺ , expresando diferentes versiones de la enzima CM-PDT. Pág 58.
14	Velocidad específica promedio producción de L-Phe (q_{Phe} promedio) durante las 10 horas que duraron los cultivos. Pág 58.
15	Principales subproductos (DHS, SHIK y CHO) y productos (L-Phe) detectados en los sobrenadantes de los cultivos en reposo. Pág 61.
16	Rendimientos absolutos de L-Phe sintetizada a partir de Glc ($Y_{Phe/Glc}$), reportados en g de Phe/g de glucosa. Pág 63.
17	Rendimientos globales de compuestos aromáticos incluyendo los intermediarios aromáticos (DHS, SHIK y CHO) y L-Phe ($Y_{Arom/Glc}$), reportados en g de aromáticos/g de glucosa. Pág 65.
18	Distribución parcial de carbono alrededor del nodo PEP en las cepas JM101 y PB12, comparadas con las cepas sobreproductoras de L-Phe. Pág 66.

Indice de tablas

Tabla

- I.** Pasos enzimáticos e intermediarios aromáticos que conforman la vía del SHIK y la vía de biosíntesis de L-Phe, así como sus reguladores y efectores alostéricos. Pág. 19.

- II.** Plásmidos, cepas y cepas modificadas por ingeniería genética y evolución de proteínas. Pág. 44.

Nomenclatura

Metabolito	Nombre
Acetil-CoA	acetil coenzima A.
CIT	citrato
CHO	corismato
DAHP	3-desoxi-D-arabino-heptulosonato 7- fosfato
DHQ	3-deshidroquinato
DHS	3-deshidrosikimato
E4P	eritrosa 4-fosfato
EPSP	5-enolpiruvilshiquimato 3- fosfato
F6P	fructosa 6- fosfato
G6P	glucosa 6-fosfato
GAP	gliceraldehido 3- fosfato
OAA	oxaloacetato
PEP	fosfoenolpiruvato
Phe	fenilalanina
PPA	prefenato
PPY	fenilpiruvato
PYR	piruvato
R5P	ribosa 5- fosfato
Ri5P	ribulosa 5- fosfato
S7P	sedoheptulosa 7- fosfato
SHIK	shiquimato
Trp	triptofano
Tyr	tirosina
X5P	xilulosa 5- fosfato

Gene	Enzima
<i>aroA</i>	EPSP sintasa
<i>aroB</i>	DHQ sintasa
<i>aroC</i>	CHO sintasa

<i>aroD</i>	DHQ deshidratasa
<i>aroE</i>	SHIK deshidrogenasa
<i>aroF, aroG, aroH</i>	DAHP sintasa
<i>aroL, aroK</i>	SHIK cinasas
GalP	Galactosa permeasa
<i>glk</i>	Glucocinasa
<i>pheA</i>	Corismato mutasa-prefenato deshidratasa
PTS	Sistema de Transporte Fosfotransferasa
<i>ptsHI, crr</i>	Proteínas generales del PTS y enzima IIA ^{Glc} , respectivamente
<i>talA</i>	Transaldolasa
<i>tktA</i>	Transcetolasa

I. RESUMEN

Diversos enfoques genéticos han sido evaluados con el fin de mejorar las capacidades biosintéticas de compuestos aromáticos en organismos como *Escherichia coli*. En general, estas estrategias están enfocadas en incrementar la disponibilidad de los precursores directos de amino ácidos aromáticos, fosfoenolpiruvato (PEP) y eritrosa 4-fosfato (E4P), ya sea inactivando las reacciones enzimáticas que los consumen o sobreexpresando las enzimas que los producen. La sobreexpresión de la enzima 3-desoxi-D-arabino-heptulosa 7-fosfato sintasa insensible a retroinhibición (DAHPS^{fbr}) es esencial en el redireccionamiento del flujo de carbono hacia la vía del shiquimato (SHIK). También resulta relevante, en el caso particular de la producción de L-fenilalanina (L-Phe), la desregulación y coexpresión de la enzima corismato mutasa-prefenato deshidratasa fbr (CM-PDT^{fbr}). En el presente estudio, mediante la aplicación de la ingeniería metabólica y la evolución dirigida de proteínas, se diseñaron los fondos genéticos adecuados para estudiar los efectos de la inactivación del Sistema de Transporte Fosfotransferasa (PTS) y sobreexpresión de diferentes versiones de la CM-PDT^{fbr} sobre el rendimiento ($Y_{Phe/Glc}$) y la productividad en cepas de *Escherichia coli*. Las cepas JM101 y sus mutantes derivadas PB12 y PB13 (fenotipo PTS⁻Glc⁺) fueron usadas como hospederos, transformándose con tres plásmidos que portan los genes que codifican para la DAHP sintasa^{fbr} (*aroG^{fbr}*), transcetolasa (*tktA*) y, ya sea, el gene truncado de la CM-PDT (*pheA^{fbr}*) o sus genes derivados evolucionados (*pheA^{ev1}* o *pheA^{ev2}*). Las mutantes PB12 y PB13 tienen el PTS inactivo. Sin embargo, son capaces de transportar y de fosforilar la glucosa empleando un sistema alternativo constituido por la permeasa de galactosa (GalP) y la actividad glucocinasa (Glc)(Flores *et al.*, 1996). Experimentos de cultivos celulares en reposo

(“resting cells”) realizados con estas cepas transformadas mostraron que JM101, PB12 y PB13 expresando las versiones evolucionadas del gene *pheA* alcanzaron los más altos rendimientos. Así, JM101-ev2, PB12-ev2 y PB13-ev2 obtuvieron $Y_{Phe/Glc}$ de 0.22 ± 0.02 , 0.33 ± 0.02 , 0.20 ± 0.02 g/g, correspondiendo al 40, 60 y 36 % del máximo teórico (0.55 g/g), respectivamente. Cantidades significativas de 3-deshidrosikimato (DHS), SHIK y corismato (CHO) fueron detectadas en los sobrenadantes de estos cultivos. Esta situación metabólica disminuyó el $Y_{Phe/Glc}$. Sin embargo, tomando en cuenta este carbono recuperado en forma de intermediarios fue posible calcular el rendimiento global de aromáticos ($Y_{Arom/Glc}$), el cual refleja el flujo de carbono relativo que es dirigido hacia la vía del SHIK. Así, los $Y_{Arom/Glc}$ oscilan entre 0.15-0.22, 0.30-0.40, 0.29-0.47 g/g para las cepas JM101, PB12 y PB13, respectivamente. Estos resultados confirman que, el fondo PTS^-Glc^+ tiene un mayor potencial para dirigir un mayor flujo de carbono hacia la vía del SHIK. Presumiblemente, esto ocurre debido a una mayor disponibilidad de PEP en las mutantes PTS^-Glc^+ comparadas con sus contrapartes PTS^+ . Sin embargo, este efecto positivo debido a la inactivación de PTS sobre el $Y_{Phe/Glc}$ sólo se apreció en PB12, en donde el mejoramiento significativo sobre el $Y_{Phe/Glc}$ fue de 50-57% comparado con su contraparte JM101. En contraste, este no fue el caso en la mutante PB13.

Por otro lado, las q_{Phe} más altas fueron alcanzadas por las cepas JM101-ev1, JM101-ev2, PB12 ev1 y PB12 ev2 alcanzando niveles similares de 40 mg/g-dcw· h. Estos valores de q_{Phe} se encuentran entre los más altos reportados en la literatura. Sin embargo, el efecto de la inactivación de PTS sobre la q_{Phe} no pudo ser observado, debido a una mayor acumulación de intermediarios en las mutantes PTS^-Glc^+ . Esta mayor acumulación,

a su vez, es causada porque el flujo de carbono dirigido a la vía del SHIK esta excediendo la capacidad metabólica de las enzimas de esta vía, llegando a ser limitantes. Esta situación metabólica permitió determinar los pasos enzimáticos limitantes en la vía del SHIK. Así, la acumulación y excreción de SHIK puede ser atribuida a limitación enzimática de las isoenzimas SHIK cinasas, codificadas por los genes *aroL* y *aroK*. Es conocido que la enzima SHIK deshidrogenasa, codificada por el gene *aroE* es inhibida por SHIK (Dell and Frost, 1993). Por consiguiente, la acumulación del DHS puede ser causada ya sea por limitación enzimática de la SHIK deshidrogenasa, por retroinhibición esta enzima por SHIK deshidrogenasa por SHIK o por ambos mecanismos.

La acumulación de CHO en las cepas que sobreexpresan la enzima truncada CM-PDT^{fbr} (*pheA^{fbr}*) indicó que ésta es limitante de la velocidad en la biosíntesis de L-Phe. En contraste, cuando las versiones evolucionadas CM-PDT^{ev1} y CM-PDT^{ev2} (*pheA^{ev1}* y *pheA^{ev2}*) fueron sobreexpresadas, no se detectó acumulación de CHO en los sobrenadantes. Estos resultados sugieren fuertemente un mejoramiento significativo en las propiedades catalíticas de la CM-PDT^{fbr} (*pheA^{fbr}*). Además, la sobreexpresión de CM-PDT^{ev1} y CM-PDT^{ev2} mejoraron significativamente el $Y_{Arom/Glc}$ y la productividad. Por lo tanto, la evolución dirigida de la CM-PDT^{fbr} resultó ser también una estrategia exitosa.

ABSTRACT

Several genetic approaches have been assessed with the goal of improving biosynthetic capabilities of aromatic compounds in microorganisms such as *Escherichia coli*. In general, these strategies focus on increasing the availability of direct precursors of aromatic amino acids, phosphoenolpyruvate (PEP) and erythrose 4-phosphate (E4P), either by inactivating key enzymatic reactions that consume them or overexpressing enzymes that produce them. The overexpression of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase feedback insensitive (DAHPS^{fb}) is essential for redirecting the carbon flux into the shikimate (SHIK) pathway. Also relevant, in the particular case of the L-Phe biosynthesis improvement, is the deregulation and overexpression of the enzyme chorismate mutase-prefenate dehydratase (CM-PDT). In the present study, metabolic engineering and directed evolution of proteins tools were applied for constructing the proper genetic backgrounds in *Escherichia coli* strains, in order to study both effects, Phosphotransferase Transport System (PTS) inactivation and the overexpression of several versions of feedback resistant CM-PDT, on the yield of L-Phe from glucose ($Y_{Phe/Glc}$) and productivity. The JM101 strain and its derivative mutants PB12 and PB13 (PTS⁻Glc⁺ phenotype) were used as hosts, they were transformed with three plasmids that harbor genes encoding for feedback resistant DAHP synthase (*aroG*^{fb}), transketolase (*tktA*) and either the truncated CM-PDT (*pheA*^{fb}) or its derivatives evolved genes (*pheA*^{ev1} or *pheA*^{ev2}). The mutants PB12 and PB13 have the inactive PTS, but they are capable of transporting and phosphorylating glucose by means of an alternative transport system constituted by the galactose permease (GalP) and the glucokinase activity (Glk)(Flores *et al.*, 1996). Resting cells experiments were carried out with these transformed strains. It was shown that JM101,

PB12 and PB13 expressing the evolved versions of CM-PDT reached the highest $Y_{Phe/Glc}$. Thus, for JM101-ev2, PB12 ev2 and PB13-ev2 the $Y_{Phe/Glc}$ were 0.22 ± 0.02 , 0.33 ± 0.02 , 0.20 ± 0.02 g/g, corresponding to 40, 60 y 36 % of the maximum theoretical yield (0.55 g/g), respectively. Significant amounts of aromatic intermediates, 3-dehydroshikimate (DHS), SHIK and chorismate (CHO), were detected in supernatants, this metabolic situation decreases the $Y_{Phe/Glc}$. Nevertheless, taking into account this recovery of carbon in the form of intermediates it was possible to calculate the global yield of aromatics ($Y_{Arom/Glc}$), which reflects the relative carbon flux directed into the SHIK pathway. Thus, the $Y_{Arom/Glc}$ ranged between 0.15-0.22, 0.30-0.40 and 0.29-0.47 g/g for JM101, PB12 and PB13 strains, respectively. These results confirm that the genetic background PTS^-Glc^+ has a major potential for directing a significant larger carbon flux into the SHIK pathway. Presumably, this occurs due to a larger PEP availability in PTS^-Glc^+ mutants compared with PTS^+ strains. However, this positive effect due to PTS inactivation on $Y_{Phe/Glc}$ only could be observed in the mutant PB12, where the $Y_{Phe/Glc}$ improvement ranged from 50 to 57 % compared with its JM101 counterpart, but it was not the case for mutant PB13.

On the other hand, the highest q_{Phe} were obtained with the strains JM101-ev1, JM101-ev2, PB12-ev1 and PB12-ev2, reaching levels of 40 mg/g-dcw \cdot h in all strains, these values are among the highest reported in the literature. However, the effect of PTS inactivation on the q_{Phe} could not be observed, mainly due to a higher intermediate accumulation in the PTS^-Glc^+ mutants caused by enzymatic limitation. This intermediate accumulation permitted us to determine the enzymatic steps that are rate limiting into the SHIK pathway. We found that SHIK accumulation and excretion can be attributed to

enzymatic limitation of isoenzymes SHIK kinases, encoded by *aroL* and *aroK* genes. It is known that SHIK dehydrogenase, encoded by *aroE* gene, is inhibited by SHIK (Dell and Frost, 1993). Accordingly, the DHS accumulation can be caused by feedback inhibition of SHIK dehydrogenase by SHIK.

The accumulation of CHO in strains overexpressing the truncated CM-PDT^{fb} (*pheA^{fb}*) indicated that this enzyme is rate limiting in the biosynthesis of L-Phe. In contrast, when the evolved CM-PDT^{ev1} and CM-PDT^{ev2} (*pheA^{ev1}* and *pheA^{ev2}*) were overexpressed, CHO accumulation was not detected in supernatants. This result strongly suggest a significant improvement in the catalytic properties of CM-PDT^{ev1} and CM-PDT^{ev2}. In addition, CM-PDT^{ev1} and CM-PDT^{ev2} improved significantly the $Y_{Arom/Glc}$ and the productivity. Therefore, the directed evolution of CM-PDT^{fb} (*pheA^{fb}*) was also a succesful strategy.

II. INTRODUCCION

La esencia de la Ingeniería Metabólica

El concepto de la manipulación de vías metabólicas para el propósito de dotar a los microorganismos con propiedades deseables es de práctica antigua. Existen muchos ejemplos excelentes de esta estrategia en áreas de producción de aminoácidos, antibióticos, solventes y vitaminas. Estos métodos están basados en mutagenesis química y técnicas de selección creativas que permitan identificar cepas mejoradas para alcanzar ciertos objetivos. Sin embargo, los perfiles metabólicos de estas cepas mejoradas han sido pobremente caracterizados y la mutagenesis permanece como un evento azaroso.

Con el desarrollo de técnicas de biología molecular de DNA recombinante se introdujo una nueva dimensión a la manipulación de vías metabólicas. Con estas herramientas ha sido posible el diseño y desarrollo de microorganismos especializados en la producción de metabolitos de interés industrial. Estos microorganismos especializados funcionan como biocatalizadores celulares convirtiendo sustratos simples, tales como los carbohidratos en sustancias de mayor valor agregado. El objetivo de la ingeniería metabólica persigue el mejoramiento dirigido de la formación de producto o de las propiedades celulares a través de la modificación de reacciones bioquímicas específicas o la introducción de propiedades nuevas con el uso de DNA recombinante (Bailey, 1991; Stephanopoulos, 1991). Esto permite la construcción de fondos genéticos bien definidos, dándole la característica esencial de *especificidad*. Una vez que las reacciones blanco son identificadas, se establecen y aplican las técnicas de biología molecular para amplificar, inhibir o inactivar, transferir o desregular los correspondientes genes o enzimas. En un amplio sentido, la recombinación *in vitro* del DNA es rutinariamente empleada en varios pasos hacia esos fines.

Por otro lado, las poderosas técnicas de evolución dirigida de proteínas, desarrolladas en la última década, emplean también el proceso de recombinación homóloga *in vitro*, haciendo posible la recombinación de una gama de genes homólogos, acelerando dramáticamente la velocidad de la evolución natural. Esto permite hacer ingeniería de proteínas aplicada a la generación de actividades enzimáticas nuevas, al mejoramiento de parámetros catalíticos de las enzimas y al mejoramiento de la producción de algún metabolito en particular, entre otras aplicaciones.

El flujo metabólico es un determinante fundamental de la fisiología celular y el parámetro más crítico de una vía metabólica. La combinación de los métodos analíticos para cuantificar los flujos y su control con técnicas de biología molecular para implementar las modificaciones genéticas sugeridas es la esencia de la ingeniería metabólica (IM). Las contribuciones básicas de la IM son la medición y el entendimiento del control del flujo *in vivo*. Además, un aspecto nuevo de la IM es el enfoque de vías metabólicas *integradas* (red metabólica) en lugar de reacciones individuales. Para el mejoramiento de los rendimientos (flujos relativos) y productividades específicas (flux) de algún metabolito particular es importante considerar no solo la vía de síntesis del metabolito (Liao *et al.*, 1994; Frost y Draths, 1995; Revisado en Berry, 1996 y Bogaerts *et al.*, 2001), sino también la red metabólica que suministra los precursores de dicho metabolito, es decir, el metabolismo central de carbono (Stephanopoulos y Vallino, 1991). Un paradigma clásico es la construcción de microorganismos recombinantes especializados en la sobreproducción de aminoácidos aromáticos. El presente trabajo se enfoca al estudio del efecto de la inactivación del PTS en cepas *Escherichia coli* diseñadas para la sobreproducción de L-Phe mediante el empleo de IM y evolución dirigida de proteínas.

3. ANTECEDENTES

3.1 LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS Y SUS COMPUESTOS DERIVADOS

3.1.1 Importancia de los aminoácidos aromáticos y compuestos derivados

La mayoría de los microorganismos tienen la maquinaria metabólica para sintetizar todos los aminoácidos esenciales para el hombre a partir de fuentes de carbono y nitrógeno. Es posible también que ciertos microorganismos puedan sobreproducir uno más grupos de aminoácidos. Numerosos microorganismos capaces de excretar amino ácidos han sido identificados, siendo la producción de este tipo de compuestos un asunto importante en la microbiología industrial. Los amino ácidos producidos en mayor cantidad por estos procesos son glutamato, lisina, fenilalanina, glutamina, arginina, triptófano, treonina, isoleucina e histidina (Krämer, 1996). Estos compuestos son de considerable relevancia industrial, ya que tienen una amplia variedad de aplicaciones, tales como aditivos alimenticios en la dieta de humanos y animales, aumentadores de aroma, productos farmacéuticos, precursores de drogas, suplementos en dietas, ingredientes en cosméticos, entre otras aplicaciones.

Particularmente, los aminoácidos aromáticos L-fenilalanina, L-tirosina, L-triptófano y sus compuestos derivados constituyen un volumen importante en el mercado mundial (Bongaerts *et al.*, 2001) (Figura 1). Por esta razón, en el área biotecnológica se han realizado considerables esfuerzos enfocados a la construcción de microorganismos recombinantes sobreproductores de compuestos aromáticos tales como fenilalanina (Förberg y col, 1988; Chen y col 1997; Weikert *et al.* 1998; Tatarko y Romeo, 2001; Báez-Viveros y col, 2004), triptófano (Katsumata e Ikeda, 1993), tirosina (Hagino y Nakayama, 1973; Ito y col., 1990; Katsumata y col, 1992) y de intermediarios aromáticos como

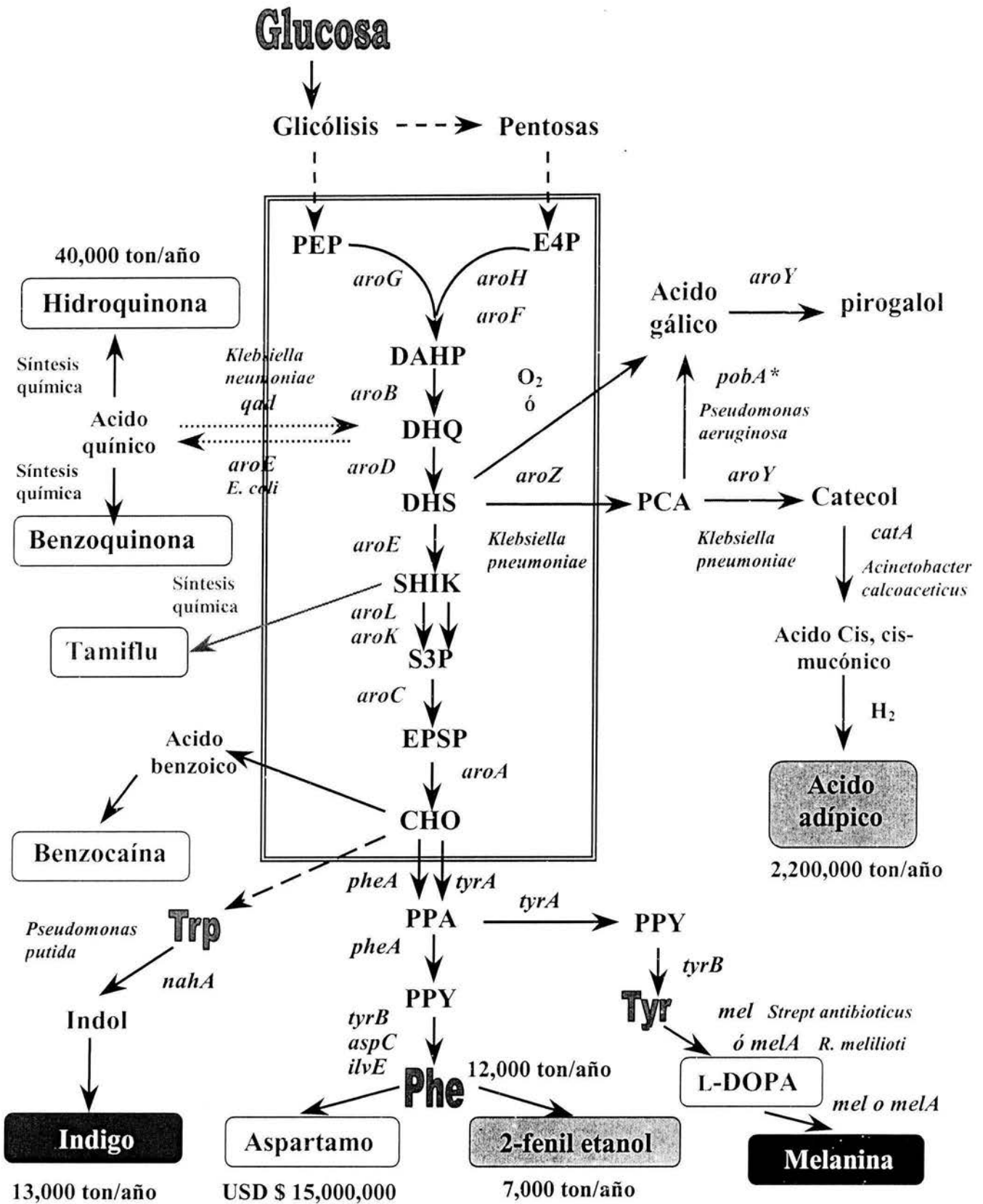


Figura 1. Compuestos de importancia industrial derivados la vía común de aminoácidos aromáticos.

3-desoxi-D-*arabino*-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) (Patnaik y Liao, 1994; Gosset y col., 1996; Báez y col., 2001), 3- deshidroquinato (DHQ) (Draths *et al.*, 1992; Ran *et al.*, 2001), ácido 3-deshidroshiquímico (DHS) (Li y col., 1999; Yi y col., 2003) y Shiquimato (SHIK) (Chandran y col., 2003), metabolitos relacionados como melanina (della-Cioppa y col, 1990), índigo (Murdock y col, 1993; Berry y col., 2002), catecol (Draths y Frost, 1991), vainillina (Ki y Frost, 1998), ácido adípico, L-dopa, aspartamo (Murata y col, 1993), ácido para-aminobenzoico (PABA)(Kaplan y Nichols, 1983; Goncharoff y Nichols BP, 1984; Green y col., 1992), entre otros.

3.1.2 Producción de DHS y ácido adípico

Un ejemplo interesante es el DHS, el cual es un intermediario aromático de la vía del SHIK que posee potentes propiedades antioxidantes (Richman *et al.*, 1996) (Figura 1). Además, el DHS es utilizado como precursor en la síntesis de catecol, ácido adípico y vainillina (Walton *et al.*, 2000; Priefert *et al.*, 2001). Vainillina es uno de los más importantes compuestos saborizantes aromáticos usados en alimentos, bebidas, perfumes y farmacéuticos, y es producido en una escala de más de 10 toneladas por año por la industria química (Priefert *et al.*, 2001).

El ácido adípico es un importante precursor químico en la manufactura del nylon 6-6, el cual es usado en la producción de alfombras, tapicería, refuerzos de llantas, autopartes, ropa, entre otros productos (Sato y col., 1998). La producción mundial anual de ácido adípico asciende a 2.2 millones de toneladas métricas por año y consiste en una tecnología refinada que minimiza la emisión de óxido nitroso (N₂O), que en este proceso es un subproducto inevitable y que se piensa es uno de los causantes del calentamiento global, del agotamiento de la capa de ozono, de lluvia ácida y del smog. A pesar de la eficiente

recuperación o reciclamiento de N₂O, 400,000 toneladas métricas son emitidas todavía cada año, las cuales corresponden de 5 a 8 % de la emisión antropogénica de N₂O (Sato y col., 1998).

La mayoría de los procesos industriales de producción de ácido adípico emplean la oxidación con ácido nítrico, del ciclohexanol o ciclohexona, los cuales provienen a su vez del benceno. Por lo tanto, el desarrollo de procedimientos prácticos que sean protectores del ambiente es deseable, particularmente, para la síntesis a media y gran escala del ácido adípico y sus derivados. Con el empleo de la ingeniería metabólica, es posible la introducción de genes heterólogos en microorganismos hospederos para derivar la producción de ácido adípico a partir del intermediario aromático DHS (Figura 1) (Niu *et al.*, 2002).

3.1.3 Producción de L-Phe, precursor del aspartamo y de 2-feniletanol

Actualmente, la producción anual de L-fenilalanina es de 11000-12000 toneladas métricas por año (Bongaerts *et al.*, 2001) teniendo un impacto económico de gran importancia. Además de su relevancia en la dieta humana y animal por ser un aminoácido esencial, la fenilalanina puede ser química o enzimáticamente convertida, ya sea en el edulcorante dietético aspartamo (L-aspartil-L-fenilalanina metil ester)(Pietsch H, 1976, Ager DJ, 1998), o en 2-feniletanol (2-PE; Etschmann *et al.*, 2002). Este último es un importante compuesto saborizante y fragante con olor a rosa, utilizado en la industria de los alimentos y en la fabricación de perfumes y cosméticos (Clark, 1990; Fabre *et al.*, 1998). La producción anual mundial de 2-PE está estimada en 7000 toneladas (Clark, 1990; Somogyi, 1996).

El aspartamo es una molécula simple formada por dos aminoácidos (ácido L-aspártico y L-fenilalanina) y metanol. El aspartamo es un potente edulcorante que es de 160 a 180 veces más dulce que la sacarosa. Por esta razón, es adicionado en los alimentos “light” en bajas cantidades, no contribuyendo significativamente en el aporte calórico (Ager *et al*, 1998). Asimismo, es consumido en más de 6000 productos por cientos de millones de personas en todo el mundo. El aspartamo tiene las más altas ventas en volumen de todos los aditivos alimenticios siendo producido al nivel industrial en grandes cantidades. El mercado mundial del aspartamo está estimado actualmente en USD\$ 1,500 millones (Ager *et al*, 1998).

El aspartamo puede ser sintetizado por métodos químicos o enzimáticos (Pietsch H, 1976; Oyama *et al.*, 1987; Ager DJ, 1998). Los métodos químicos de importancia industrial involucran la deshidratación del ácido L-aspártico para formar el anhídrido ácido, el cual es entonces acoplado con la L-fenilalanina o su metil éster para generar el producto deseado (Ager DJ, 1998); mientras que como resultado de la estructura dipéptido del aspartamo, los métodos bioquímicos involucran muchas variaciones de proteólisis reversa, utilizando enfoques controlados cinética y termodinámicamente (Ager DJ, 1998).

Por otro lado, el aspartamo es metabolizado por esterasas y peptidasas digestivas generándose los tres compuestos anteriormente mencionados, los cuales habitualmente se encuentran presentes en los alimentos en mayor concentración que en el consumo típico de este edulcorante, por lo que se le considera un aditivo alimenticio seguro. A este respecto, pueden consultarse reportes científicos sobre la evaluación de efectos colaterales en humanos (Butchko and Stargel, 2001; Spiers *et al.*, 1998).

4.1.4 Síntesis de aminoácidos aromáticos: métodos químicos versus bioquímicos

Actualmente, los compuestos aromáticos son sintetizados por métodos químicos tradicionales empleando materias primas tales como el benceno, tolueno y xileno provenientes de fuentes no renovables como el petróleo. Asimismo, los métodos químicos causan problemas de contaminación ambiental al usar sustancias potencialmente tóxicas y cancerígenas como el benceno. Además de estos inconvenientes, en la síntesis química se generan mezclas racémicas de L- y D-aminoácidos que dificultan la purificación de los mismos. Por estas razones, es necesario el desarrollo de rutas alternativas de síntesis de aminoácidos aromáticos, a través del empleo de tecnologías limpias que utilicen materias primas renovables y económicas, tales como los carbohidratos (por ejemplo: D-glucosa). Una alternativa a los métodos de síntesis química es el empleo de microorganismos modificados genéticamente para crear una nueva entidad catalítica capaz de convertir eficientemente los carbohidratos simples como la D-glucosa en los productos deseados como los aminoácidos aromáticos.

3.2 ANALISIS DE VIAS METABOLICAS EN *Escherichia coli*.

3.2.1 Sistema de Transporte Fosfotransferasa (PTS) y Metabolismo Central de Carbono.

Escherichia coli utiliza un sistema de proteínas y enzimas para el proceso de transporte y fosforilación de la glucosa y de otros carbohidratos, conocido como Sistema de Transporte Fosfotransferasa (PTS) (Figura 2) (Postma *et al.*, 1987). El PTS es un transportador activo bastante eficiente que transloca azúcares contra un gradiente de concentración. Este sistema complejo, involucra la participación de al menos cuatro proteínas diferentes que funcionan dentro de la célula como transportadores del grupo

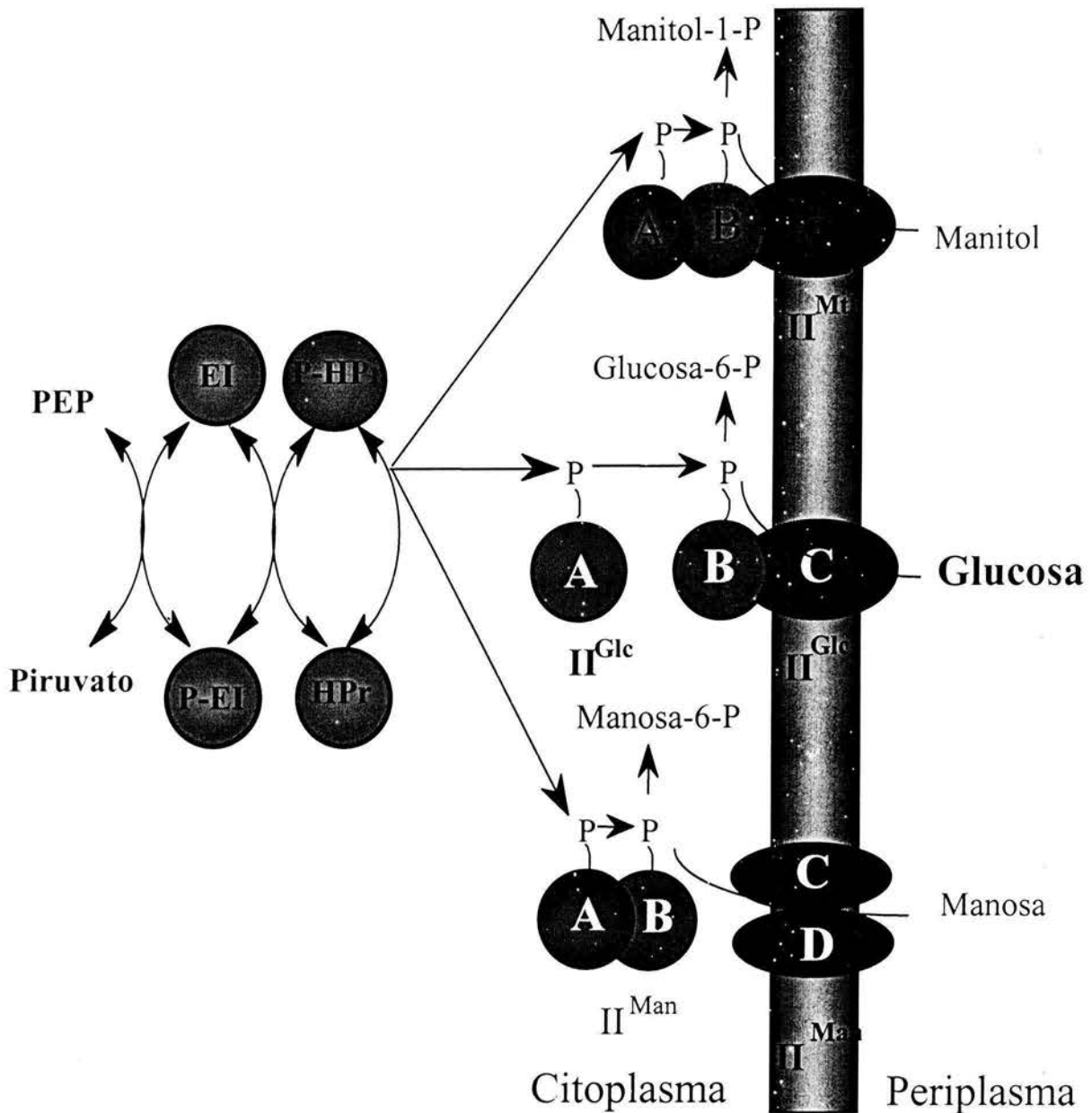


Figura 2. Componentes del Sistema de Transporte Fosfotransferasa (PTS).

fosfato de alta energía del PEP al azúcar entrante. Dos de estas proteínas son solubles, citoplasmáticas y comunes a todos los carbohidratos, y son conocidas como *proteínas generales del PTS*: Enzima I (EI) y Proteína Histidina (HPr), codificadas en el operón *ptsHI*. En contraste, las enzimas II son carbohidrato-específicas y consisten de tres dominios A, B y C. La enzima II específica para glucosa está constituida por un dominio

soluble A, designado EAII^{Glc} (codificado por el gene *crr*) y dos dominios B y C que están unidos a membrana. Estos funcionan como transportador del grupo fosfato (dominio B) y formador del canal de translocación de la glucosa (dominio C)(Figura 2). En el PTS, el PEP es el donador del grupo fosfato que es transferido al azúcar entrante vía los intermediarios fosforilados de EI → HPr → EIIA → EIIB. Estequiométricamente, 1 mol de PEP es requerido para fosforilar 1 mol de glucosa, produciéndose concomitantemente 1 mol de piruvato. Por cada mol de glucosa fosforilada es posible producir como máximo 2 moles de PEP, asumiendo que todo el carbono es metabolizado por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas. En tal caso, el 50 % del PEP producido sería utilizado para el transporte y fosforilación de la glucosa. Este hecho obviamente implica un alto gasto de consumo de PEP.

En la figura 3 se esquematiza la red del metabolismo central de carbono acoplado con la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en *Escherichia coli*. Esta red describe la producción de los tres aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina y triptofano, usando glucosa como única fuente de carbono y está constituida principalmente por el PTS, las vías glicolíticas designadas como Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y la vía de las pentosas fosfato (PP). EMP y PP generan energía libre de Gibbs, principalmente en forma de ATP, poder reductor en forma de NADPH que es requerido en las reacciones biosintéticas, y los metabolitos precursores requeridos en la biosíntesis de bloques de construcción o esqueletos de carbono. La vía EMP genera también PEP, que es uno de los precursores directos utilizados en la síntesis de aminoácidos aromáticos, mientras que el segundo precursor eritrosa 4-fosfato (E4P) es producido en la vía PP. En *E. coli*, el flujo glicolítico es controlado por la demanda de ATP en pasos enzimáticos clave de la vía EMP: fosfofructocinasa y piruvato cinasa (Koebmann *et al.*, 2002a). Sin embargo, el control por

ATP depende fuertemente del organismo y las condiciones de crecimiento (Koebmann *et al.*, 2002b).

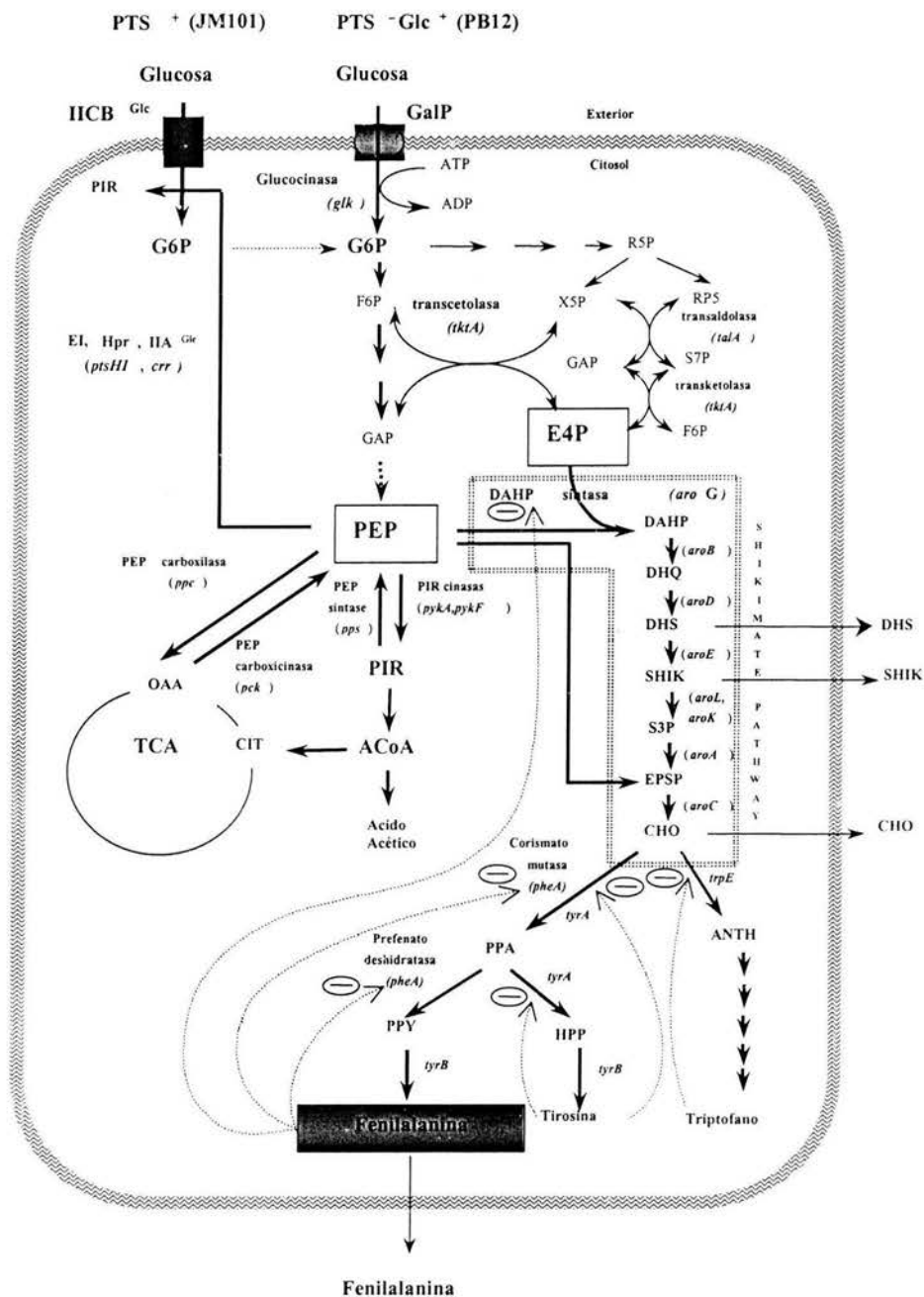


Figure 3. Red metabólica relacionada a la biosíntesis de L-Phe en *E. coli*, mostrando los sistemas empleados para transportar y fosforilar la glucosa en cepas silvestres y en mutantes PTS⁻ Glc⁺. Las vías metabólicas centrales que generan los precursores PEP y E4P en la vía del SHIK (rodeada por una doble línea punteada) también son mostradas. La vía del SHIK consiste de siete pasos enzimáticos que catalizan la conversión de PEP y E4P hasta corismato; en este punto ramificado, el flujo de carbono es distribuido a través de las vías aromáticas terminales. Los puntos principales que están sujetos a retroinhibición por producto son

indicados por flechas punteadas. Símbolos metabólicos: G6P, glucosa 6-fosfato; F6P, fructosa 6- fosfato; GAP, gliceraldehído 3- fosfato; R5P, ribulosa 5- fosfato; R5P, ribosa 5- fosfato; X5P, xilulosa 5- fosfato; S7P, sedoheptulosa 7- fosfato; PYR, piruvato; PEP, fosfoenolpiruvato; E4P, eritrosa 4- fosfato; DAHP, 3-desoxi-D-*arabino*-heptulosoato 7- fosfato; DHQ, 3-deshidroquinato; DHS, 3-deshidrosiquimato; SHIK, shiquimato; EPSP, 5-enolpiruvilshiquimato 3- fosfato; CHO, corismato; PPA, preferato; PPY, fenilpiruvato; Phe, fenilalanina; Tyr, tirosina; Trp, triptofano; OAA, oxaloacetato; CIT, citrato; ACoA, acetil coenzima A. Símbolos de proteínas y genes: PTS, Sistema de Transporte Fosfotransferasa; GalP, galactosa permeasa; *glk*, glucocinasa; *ptsHI*, *err*, proteínas generales del PTS y enzima IIA^{Glc}, respectivamente; *talA*, transaldolasa; *tktA*, transcetolasa; *aroG*, DAHP sintasa; *aroB*, DHQ sintasa; *aroD*, DHQ deshidratasa; *aroE*, SHIK deshidrogenasa; *aroL*, *aroK*, SHIK cinasa; *aroA*, EPSP sintasa; *aroC*, CHO sintasa; *pheA*, corismato mutasa-preferato deshidratasa.

3.2.2 Estructura de la vía del Shiquimato

La vía común de aminoácidos aromáticos o vía del shiquimato (SHIK) es la ruta común de biosíntesis de aromáticos que comprende la serie de siete reacciones enzimáticas desde la condensación de E4P y PEP hasta la formación de corismato (CHO) y es esquematizada en la Figura 5 y Tabla 1. CHO es el nodo ramificante en donde el carbono diverge hacia la producción de fenilalanina, tirosina, triptófano, ubiquinona, menaquinona, ácido fólico, enteroquelina y vitaminas aromáticas (ácidos *p*-aminobenzoico, *p*-hidroxibenzoico, y 2-3 dihidroxibenzoico) (Pittard, 1996; Herrmann y Weaver 1999; Dewick PM, 1998). La vía del shiquimato (SHIK) constituye una parte del metabolismo encontrado en procariontes, levaduras, hongos filamentosos, parásitos y plantas, en contraste, nunca en animales (Herrmann y Weaver 1999; Keeling *et al.*, 1999). La vía es por lo tanto un importante blanco para herbicidas (Kishore y Shah, 1988), antibióticos y vacunas vivas (Foulongne *et al.*, 2001). Todos los sustratos y productos de estas enzimas, así como los intermediarios de la vía son idénticos en procariontes y en organismos eucariontes, las diferencias son encontradas en algunas enzimas (Herrmann y Weaver 1999).

Los intermediarios de la vía del SHIK sirven también como puntos iniciales para la biosíntesis de productos secundarios. Por otro lado, en plantas los aminoácidos aromáticos son precursores de una gran variedad de metabolitos secundarios (Dewick PM, 1998). Claramente, la vía del SHIK es de eminente importancia en la biosíntesis de muchos compuestos de interés comercial.

Tabla I. Pasos enzimáticos e intermediarios aromáticos que conforman la vía del SHIK y la vía de biosíntesis de L-Phe, así como sus reguladores y efectores alostéricos.

Número de Reacción	Enzima	gene	Regulación	Producto sintetizado
1	3-desoxi-D- <i>arabino</i> -heptuloseonato 7-fosfato (DAHP) sintasa	<i>aroF</i> , <i>aroG</i> , <i>aroH</i>	<i>tyrR/trpR</i> , Tyr, Phe, Trp	DAHP
2	3-deshidroquinato (DHQ) sintasa	<i>aroB</i>		DHQ
3	3-deshidroquinato (DHQ) deshidratasa	<i>aroD</i>		DHS
4	3-dehidrosiquimato (DHS) deshidrogenasa	<i>aroE</i>	SHIK	SHIK
5	Shiquimato cinasa I/II	<i>aroL</i> , <i>aroK</i>	<i>tyrR</i> , <i>trpR</i>	S3P
6	5-enolpiruvilshiquimato 3-fosfato (EPSP) sintasa	<i>aroA</i>		EPSP
7	Corismato (CHO) sintasa	<i>aroC</i>		CHO
---	Corismato mutasa/prefenato deshidratasa (CM-PDT)	<i>pheA</i>	<i>tyrR</i> , Phe	PPA y PPY
---	Amino-transferasas	<i>tyrB</i> , <i>aspC</i> , <i>ilvE</i>		Phe

3-Desoxi-D-*Arabino*-Heptuloseonato 7-Fosfato Sintasa

El primer paso enzimático de la vía del SHIK condensa los precursores directos E4P y PEP para producir el primer intermediario designado 3-Desoxi-D-*Arabino*-Heptuloseonato 7-fosfato (DAHP) y fosfato. Esta reacción es catalizada por la enzima DAHP sintasa. *Escherichia coli* posee tres isoenzimas DAHP sintasas (DAHPS) que son designadas como DAHPS (Tyr), DAHPS (Phe), DAHPS (Trp) dependiendo del aminoácido que cause su retro-inhibición. Estas DAHPS son codificadas por los genes estructurales homólogos

aroF, *aroG* y *aroH*, respectivamente (Figura 4). Cada una de las tres DAHPS es controlada a nivel transcripcional y alostérico por cada uno de los aminoácidos aromáticos: tirosina,

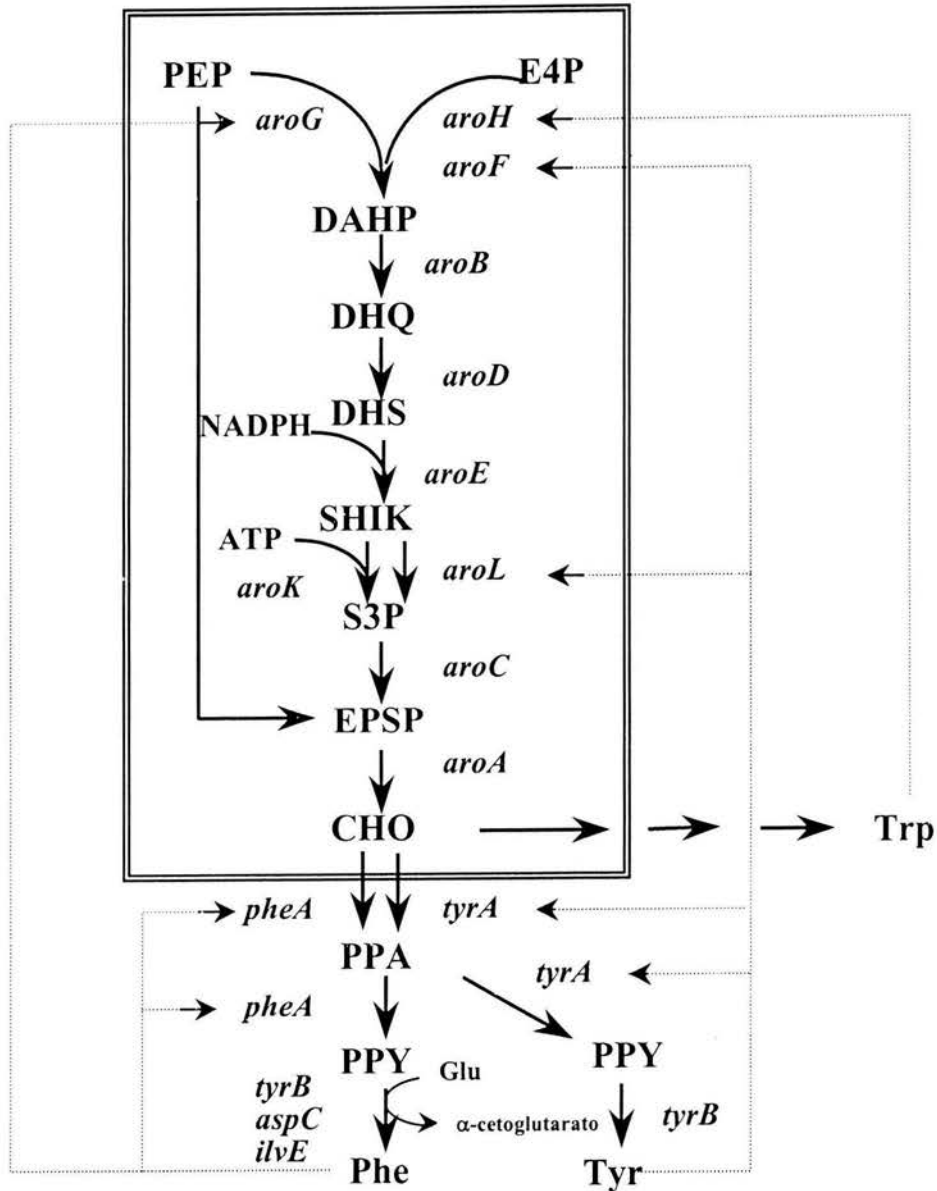


Figura 4 . Circuito regulatorio de la vía común de síntesis de aminoácidos aromáticos y vías terminales de Phe, Tyr y Trp.

fenilalanina y triptófano (Pittard, 1996). Se han sido identificados dos genes reguladores, *tyrR* y *trpR* que están involucrados en el control de las DAHP sintasas. En presencia de L-

Trp, el producto del gene regulador reprime la síntesis de DAHPS (Trp), mientras que, el producto del gene *tyrR* está implicado junto con L-Tyr en la represión de DAHPS (Tyr) y con L-Phe en la represión de la síntesis de DAHPS (Phe) (Pittard, 1996). La regulación a nivel transcripcional de las DAHPS es eliminada colocando estos genes bajo el control de promotores que no son controlados por TrpR/TyrR, o por delección de los reguladores (Berry, 1996; LaDuca *et al.*, 1999).

La contribución de cada una de las tres isozimas DAHPS a la actividad enzimática total ha sido determinada en una cepa de *Escherichia coli* silvestre creciendo en medio mínimo (Tribe *et al.*, 1976). Así, AroF contribuye con el 20 %, AroG 80 %, mientras que AroH tiene solamente una contribución marginal a la actividad enzimática total. En cepas sobreproductoras de aminoácidos aromáticos, la actividad DAHPS es fuertemente reducida como resultado de la retroinhibición alostérica por producto final.

Numerosos cambios mutagénicos en las tres isozimas DAHP sintasas de *E. coli* que causan una resistencia parcial o completa a inhibición por el correspondiente aminoácido aromático han sido identificados. Estos cambios fueron derivados ya sea por mutagénesis química al azar o mutagénesis dirigida de los respectivos genes. El empleo de análogos de aminoácidos es una estrategia que ha sido exitosamente usada para la selección de mutantes insensibles a retroinhibición (Hagino y Nakayama, 1974; Ray *et al.*, 1988). Debido a que las secuencias y las propiedades catalíticas de las tres isoformas son muy similares, los resultados de los estudios mutagénicos han sido extendidos de DAHPS (Trp) y DAHPS (Tyr) a DAHPS (Phe), proponiéndose un sitio común de unión al inhibidor de 9 aminoácidos (Pro19, Asp146-Ala154, Gly178-Ser180) (Shumilin *et al.*, 1999). Por otro lado, la supresión completa de retroinhibición por L-Phe en DAHPS debida a un cambio de un solo amino ácido (Asp₁₄₆Asn) fue reportada por Kikuchi *et al.*, (1997). La desregulación

de las DAHPS es una estrategia esencial en la construcción de microorganismos sobreproductores de aminoácidos, ya que es uno de los principales cuellos de botella en la biosíntesis aminoácidos aromáticos. Subsecuentemente, los intermediarios aromáticos son metabolizados por seis pasos enzimáticos más hasta la formación de corismato (CHO) (Figura 4, tabla I).

La síntesis de las enzimas de la vía del SHIK (excepto DAHPS y SHIK cinasas) en *Escherichia coli* no es afectada por la inactivación de los genes reguladores *tyrR* y *trpR*, ni está sujeta a regulación específica por ninguno de los aminoácidos aromáticos, DAHP o CHO, por lo que se asume que es constitutiva (Tribe *et al.*, 1976). Se ha observado que la síntesis de las enzimas de la vía del SHIK responden coordinadamente con la velocidad de crecimiento (Rose y Yanofsky, 1972; Tribe *et al.*, 1976). *E. coli* posee dos enzimas SHIK cinasa codificadas por los genes homólogos *aroL* y *aroK*. Existe evidencia de alguna forma en el control específico del producto del gene *tyrR* en presencia de tirosina sobre la represión de *aroL* (Tribe *et al.*, 1976). Asimismo, ha sido reportado que la SHIK deshidrogenasa (*aroE*) puede ser retroinhibida por SHIK (Dell and Frost, 1993).

3.2.3 Vía de Síntesis de Fenilalanina

Corismato mutasa/prefenato deshidratasa CM-PDT.

Las vías terminales para la biosíntesis de Tyr, Phe, Trp también están sujetas a un fuerte control transcripcional y alostérico. Particularmente, en *E. coli* la vía de biosíntesis de L-Phe comienza con la conversión del CHO a prefenato (PPA) y del PPA a fenilpiruvato (PPY) (Figura 4). Estas dos reacciones son catalizadas por la enzima bifuncional corismato mutasa-prefenato deshidratasa (CM-PDT) codificada por el gene *pheA*, el cual está sujeto a regulación por mecanismos de represión mediada por operador y atenuación. Además, la

CM-PDT es retro-inhibida alostéricamente por unión con L-Phe a concentraciones mayores a 1 mM (Gowrishankar y Pittard, 1982; Im y Pittard, 1971; Zurawski *et al.*, 1978). La proteína CM-PDT contiene 386 residuos de aminoácidos y existe como homodímero en la forma catalíticamente activa. Las mutantes CM-PDT en *E. coli* han sido construidas por modificación del Trp226 y Trp338 (Gething *et al.*, 1976) y por sustitución de Ser330 o por eliminación de los residuos de aminoácidos localizados después de este residuo. Mutaciones en los codones 304 a 310 del gene *pheA* exhiben casi completa resistencia a retro-inhibición incluso a concentraciones muy altas de L-Phe (Nelms *et al.*, 1992). La interacción de L-Phe con dominios los regulatorios de la CM-PDT ha sido investigada en mayor detalle (Zhang *et al.*, 1998; Pohnert *et al.*, 1999). Zhang y col., (1998) mapearon las actividades catalíticas CM (residuos 1-109) y PDT (residuos 101-205) en distintos dominios de la proteína PheA (CM-PDT), los cuales pueden ser expresados como enzimas discretas exhibiendo una actividad catalítica completa. Asimismo, se demostró que la unión con L-Phe y retro-inhibición es mediada también por un dominio regulatorio independiente (residuos 286-386) (Zhang *et al.*, 1998; Pohnert *et al.*, 1999). La remoción del dominio R elimina el efecto de retro-inhibición por L-Phe. Sin embargo, esta delección disminuye la afinidad de CM por corismato y de PDT por prefenato. Las interacciones específicas de L-Phe con el dominio R han sido determinadas por mutagénesis sitio dirigida y titulaciones calorimétricas en regiones conservadas del dominio R (residuos 309-312, 329-332 y 374) (Pohnert *et al.*, 1999).

3.3 Rendimientos y Productividades

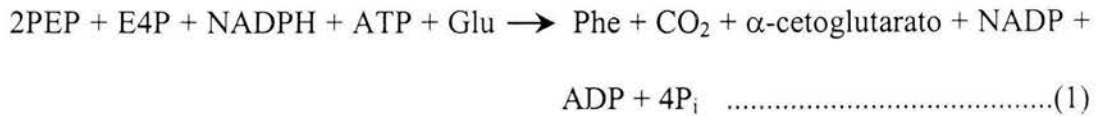
En el análisis cuantitativo de la fisiología celular, uno de los intereses básicos es la evaluación macroscópica de la distribución global de los flujos metabólicos. La distribución

global de los flujos metabólicos es normalmente representada por los llamados *coeficientes de rendimientos*. Estos nos dicen cuanto carbono proveniente del sustrato (glucosa) es recobrado en forma de producto (metabolito de interés), y son usualmente definidos como flujos globales con respecto a un compuesto de referencia, frecuentemente es la fuente de carbono o biomasa. Por lo tanto, los coeficientes de rendimiento son adimensionales y toman la forma de unidad de masa del metabolito por unidad de masa de la referencia (ej, moles de L-Phe por moles de glucosa consumida).

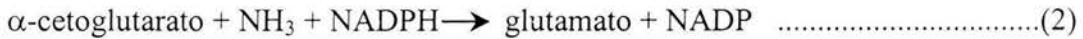
El rendimiento y la productividad son parámetros relevantes para evaluar el impacto de las modificaciones genéticas celulares. El rendimiento primeramente impacta el costo de la materia prima y es afectado por la redirección de los flujos metabólicos hacia la formación del producto deseado. Por otro lado, la productividad, es el determinante clave del costo capital del equipo de bioproceso y puede ser mejorada por la amplificación de los flujos metabólicos. La optimización de un proceso global debe incluir ambos parámetros.

Los rendimientos teóricos pueden ser calculados para la conversión de sustrato a producto a partir del análisis de flujos teóricos de una reacción global o de una red de reacciones biosintéticas. El rendimiento máximo teórico no es sólo una propiedad inherente del par producto-sustrato particular, sino que depende críticamente de la vía metabólica particular que cataliza la reacción global.

Para el cálculo de los rendimientos teóricos se asume que no hay formación de subproductos, excepto aquellos que estén estequiométricamente acoplados a la formación del producto deseado. La estequiometría para la síntesis de L-Phe puede ser derivada de la vía común de síntesis de aminoácidos aromáticos que lleva a la formación del CHO y a los tres pasos finales de a L-Phe, resultando (reacción 1):



Glutamato es formado de acuerdo con la reacción 2:



Combinando las reacciones 1 y 2, es evidente que el esqueleto de carbono del glutamato es preservado. Sin embargo, hay un requerimiento adicional de NADPH, (si NH₃ es incorporado vía glutamina también hay un requerimiento adicional de ATP), como se muestra en la reacción 3:



Los coeficientes de rendimientos máximos teóricos de L-Phe ($^{\max} Y_{\text{Phe}/\text{Glc}}$), sintetizada de glucosa como única fuente de carbono han sido calculados a partir del conocimiento de la estequiometría de la biosíntesis de L-Phe en diferentes escenarios metabólicos (Forberg *et al.*, 1988, Patnaik *et al.*, 1994). Por ejemplo, en cepas silvestres de *E. coli* donde PTS está convirtiendo PEP a PYR durante el transporte de glucosa, y el PYR no está siendo reciclado a PEP a través de la enzima PEP sintasa, el $^{\max} Y_{\text{Phe}/\text{Glc}}$ es 0.275 g/g. Por otro lado, en una cepa que ha sido modificada por ingeniería genética, ya sea que tenga PTS inactivo o que PYR sea reciclado a PEP, $^{\max} Y_{\text{Phe}/\text{Glc}}$ puede ser teóricamente incrementado al doble, es decir 0.55 g/g.

3.4 INGENIERIA DEL METABOLISMO CENTRAL DE CARBONO

3.4.1 Incremento en la disponibilidad de E4P.

3.4.1.1 Sobreexpresión de transcetolasa (*tktA*) y transaldolasa (*tal*)

Las enzimas clave del brazo no-oxidativo de la vía PP son transcetolasa y transaldolasa. Estas enzimas catalizan reacciones que llevan a fructosa 6-P, gliceraldehído 3-phosphato, (nodos que ligan la vía EMP con PP) y por otro lado, a E4P. El gene *tktA* que codifica la enzima transcetolasa fue sobreexpresado en una cepa de *E. coli* que acumula DAHP debido al bloqueo en el gene *aroB* (3-dehidroquinato sintasa) (Draths et al, 1992). El efecto de la sobreexpresión de *tktA* resultó en un incremento significativo de la disponibilidad de E4P, el cual fue determinado indirectamente por el incremento en la síntesis de DAHP, mediante la coexpresión de una DAHP sintasa insensible a retroinhibición. De una forma análoga, el impacto de la sobreexpresión del gene *talB* que codifica para la transaldolasa fue también analizado, observándose que la síntesis de DAHP fue incrementada significativamente (Lu y Liao, 1997). Sin embargo, la co-expresión de simultánea de *talB* y *tktA* no genera incrementos adicionales en el flujo de carbono hacia DAHP (Lu y Liao, 1997). Por consiguiente, con la sola expresión ya sea de *talB* o *tktA* se obtiene un efecto similar sobre el rendimiento de DAHP.

3.4.1.2 Empleo de azúcares no-PTS

En el contexto de la producción de compuestos aromáticos, el piruvato producido por el PTS representa un desperdicio importante de carbono mismo que puede ser evitado mediante el empleo de azúcares no-PTS tales como la xilosa (Frost y Draths, 1995; Patnaik et al., 1995). En cepas de *E. coli* que sólo sobreexpresan de la actividad DAHP sintasa, la producción de DAHP a partir de xilosa alcanza el máximo rendimiento teórico molar

(0.71). No se observó ningún incremento adicional en el rendimiento debido a la sobreexpresión adicional de transcetolasa o de PEP sintasa (Patnaik *et al.*, 1995). La explicación a este hecho es que, bajo esta condición de crecimiento en xilosa existe un alto flujo de carbono a través de la vía de las pentosas fosfato, suministrando suficiente E4P para la síntesis de DAHP.

3.4.2 Incremento en la disponibilidad de fosfoenolpiruvato (PEP).

Aunque las redes metabólicas contienen un gran número de ramificaciones o nodos, usualmente solo pocos nodos son relevantes para implementar cambios sobre éstos que impacten significativamente el rendimiento producto-sustrato. Solamente Glc6P y PEP son considerados como los nodos de interés principal en la red biosintética de los aminoácidos aromáticos. PEP es un intermediario clave en la síntesis de varios procesos celulares y representa un importante nodo dentro del metabolismo central (Figura 6) (revisado por Valle *et al.*, 1996), ya que en este punto converge la mayor parte del flujo decarbono consumido y diverge, en su mayoría, hacia la formación de piruvato, ya sea a través del PTS, de las isozimas piruvato cinasas o hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) mediante la reacción anaplerótica catalizada por la PEP carboxilasa (*ppc*). Normalmente, sólo un pequeño porcentaje del PEP es canalizado hacia la biosíntesis de aminoácidos aromáticos a través de las isozimas DAHP sintasas. En estudios pioneros (Holms, 1986), los flujos metabólicos fueron calculados en *E. coli* y los cocientes de partición de flujos fueron reportados. Sin embargo, en estudios recientes empleando metodologías modernas y precisas, basadas en modelos estequiométricos de reacciones, balances de masas de metabolitos intracelulares, datos de aminoácidos proteinogénicos obtenidos por GC-MS o NMR, el análisis de flujo de carbono de cepas de *E. coli* fue realizado (Flores *et al.*, 2002;

Emmerling *et al.*, 2002; Zhao and Shimizu, 2003). En el trabajo de Flores y col. (2002), el estudio de distribución de flujos metabólicos se realizó en condiciones de aerobiosis, con células creciendo en fase exponencial cultivadas medio mínimo M9 usando glucosa como única fuente de carbono.

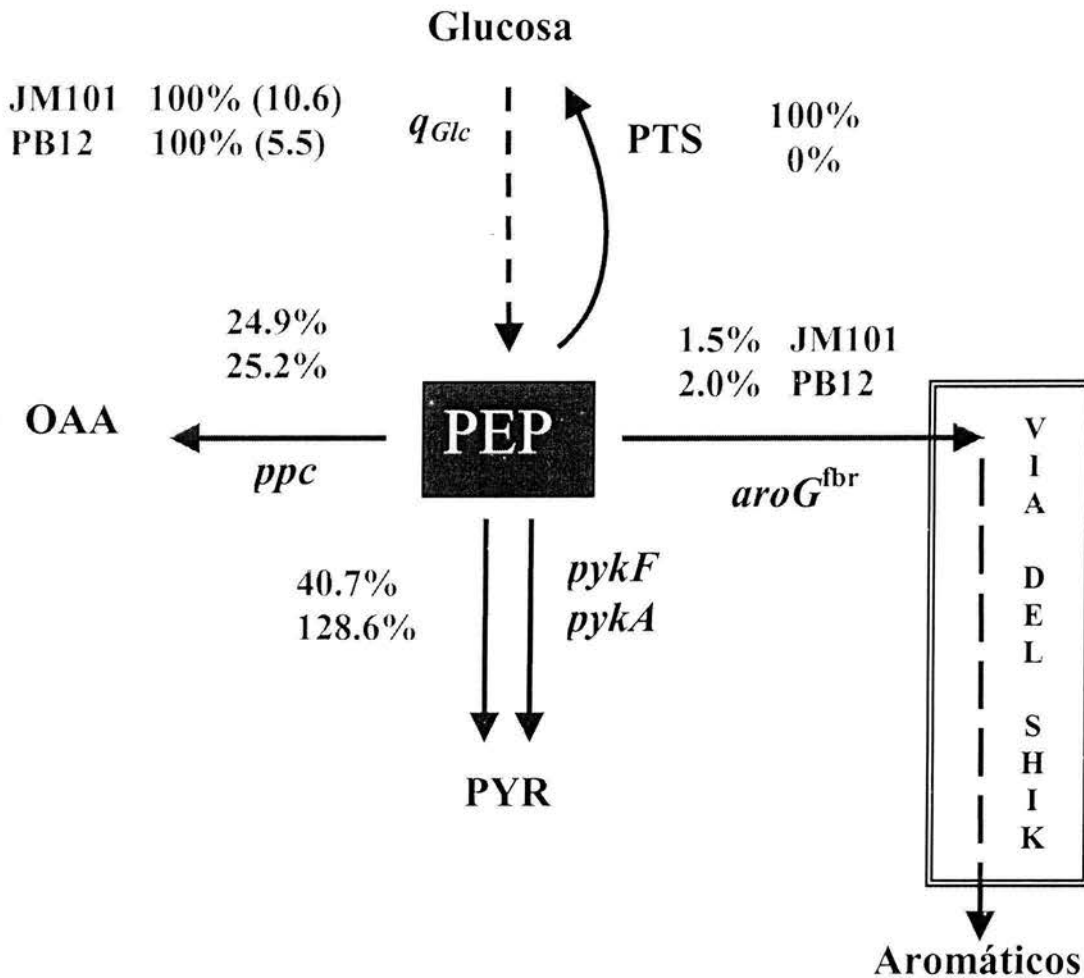


Figura 5. Distribución de flujos carbono alrededor del nodo PEP en cepas silvestres y mutantes PTS (datos tomados de Flores *et al.*, 2002). Los flujos relativos están reportados como porcentajes de la velocidad específica de consumo de glucosa, q_{Glc} . Los números entre paréntesis corresponden a los valores medidos de q_{Glc} , reportados en mmol de glucosa/(g de biomasa · hora).

De acuerdo este último trabajo, la distribución de flujos de carbono relativos (referidos como porcentajes molares de consumo de glucosa) en el nodo PEP es mostrada

en la Figura 5, siendo el PTS es el mayor consumidor de PEP (100 %), seguido por las piruvato cinasas (40.7) y PEP carboxilasa (24.9 %). En contraste a esos flujos de carbono relativamente altos, el flujo de carbono relativo que es dirigido a la biosíntesis de aminoácidos aromáticos es alrededor de 1.5 %. Aunque las magnitudes de estos flujos relativos pueden variar de acuerdo con las condiciones de cultivo, esta información resulta relevante para plantear y evaluar las estrategias enfocadas a redireccionar los flujos metabólicos con el objeto de optimizar la biosíntesis de los compuestos aromáticos.

3.4.2.1 Inactivación de las piruvato cinasas (*pykA*, *pykF*)

Las dos piruvato cinasas (*pykA*, *pykF*) de *E. coli* representan otra actividad consumidora de PEP. El efecto de la inactivación independiente y simultánea de estas dos enzimas fue evaluada sobre la capacidad de síntesis del primer intermediario en la vía del SHIK (DAHP) (Gosset *et al.*, 1996). La inactivación individual de cada piruvato cinasa no causó un efecto relevante sobre la acumulación de DAHP. Sin embargo, la inactivación simultánea de ambas isoenzimas incrementó significativamente la acumulación de DAHP en el fondo genético PTS⁻Glc⁺ (Gosset *et al.*, 1996). Sin embargo, la velocidad específica de crecimiento disminuyó significativamente.

3.4.2.2 Inactivación de PEP carboxilasa (*ppc*)

La biosíntesis de L-Phe fue significativamente incrementada a causa de la inactivación de la PEP carboxilasa en una cepa de *E. coli*. Sin embargo, la producción de subproductos no deseados como acetato y piruvato fueron también incrementados (Miller *et al.*, 1987). Además, el crecimiento de las mutantes *ppc*⁻ se redujo a la mitad del observado en una cepa silvestre. Además, estas mutantes requieren la adición de co-sustratos tales

como ácido succínico para poder crecer. En contraste, en una cepa productora de DAHP (*aroB⁻*), la inactivación del gene *ppc* no causó ningún efecto positivo (Patnaik y Liao, 1994). Esta discrepancia fue explicada con las diferentes condiciones utilizadas, crecimiento versus no-crecimiento, y las diferencias fenotípicas entre las cepas hospederas.

3.4.2.3 Inactivación del PTS (*ptsHI*, *crr*)

En varios trabajos se ha llevado a cabo la escisión (“deletion”) de algunos genes del sistema de transporte fosfotransferasa (*ptsHI*, y *crr*) para evaluar la importancia de la inactivación del PTS (Gosset *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Báez *et al.*, 2001, Yi *et al.*, 2003; Chandran *et al.*, 2003). La distribución de flujos metabólicos en el nodo PEP (Flores *et al.*, 2002) indica que cualquier inactivación de las principales reacciones consumidoras de PEP (PTS, *Ppc*, *PykA* y *PykF*) tendría un efecto positivo sobre la disponibilidad de PEP. Sin embargo, la inactivación del PTS sugiere el mayor impacto positivo sobre la disponibilidad de PEP, y por lo tanto, sobre el rendimiento de compuestos aromáticos. Por consiguiente, nuestro grupo ha puesto énfasis en el desarrollo de mutantes desprovistas del PTS (fenotipo $\text{PTS}^- \text{Glc}^+$). Estas mutantes han sido seleccionadas mediante cultivo continuo por su capacidad de crecer rápidamente usando glucosa como única fuente de carbono. En estas mutantes, la glucosa es transportada y fosforilada por un sistema alternativo: galactosa permeasa (*GalP*) y glucocinasa (*Glk*) que emplea ATP como donador de fosfato en lugar de PEP (Figura 3) (Flores *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 2002). En este contexto, el efecto de la inactivación del PTS y el transporte de glucosa dependiente de *GalP* sobre el rendimiento absoluto del primer intermediario en la vía del SHIK (DAHP) ha sido evaluado en cepas isogénicas inactivadas en DHQ sintasa (*aroB⁻*), que expresan simultáneamente los genes *aroG^{fb}* y *tklA* (Báez *et al.*, 2001). En este último trabajo, se determinó que el rendimiento

de DAHP a partir de glucosa ($Y_{\text{DAHP/Glc}}$) fue incrementado significativamente de 50 % del rendimiento máximo teórico para cepa PTS^+ a 83 % para su contraparte PTS^-Glc^+ , demostrándose así, el efecto positivo de la inactivación del PTS.

3.4.2.4 Sobreexpresión de PEP sintasa (*pps*)

El carbono en forma de piruvato (PYR) que es producido por PTS es desviado fuera de la vía del SHIK debido a que en condiciones glicolíticas, PYR no es reciclado a PEP por la enzima PEP sintasa (*pps*). Sin embargo, por sobreexpresión de *pps*, el piruvato producido ya sea por PTS o piruvato cinasas, puede ser reconvertido a PEP. El efecto positivo de la inactivación de *pps* sobre el flujo de carbono hacia la producción de DAHP, fue solo significativo con la sobreexpresión simultánea de DAHP sintasa insensible a retroinhibición y *tktA*, sugiriendo que la concentración de E4P es el primer sustrato limitante de la DAHP sintasa, seguido de PEP (Patnaik y Liao, 1994; Liao *et al.*, 1996).

La “ingeniería metabólica global” es un enfoque nuevo introducido que es aplicado cuando se manipula una red regulatoria global que controla el flujo de las vías centrales de carbono (Tartako y Romeo, 2001). En este trabajo ha sido reportado que la interrupción del gene *csrA* (regulador de almacenamiento de carbono) aumenta el flujo de carbono dirigido hacia la síntesis de L-Phe en cepas que expresan simultáneamente *aroG^{br}* y *pheA^{br}*. Presumiblemente, este hecho ocurre debido a que el producto del gene *csrA* regula negativamente a PEP sintasa (*pps*) y PEP carboxicinasasa (*pck*) y positivamente regula a piruvato cinasa (*pykF*) (Sabnis *et al.*, 1995; Tartako y Romeo, 2001), resultando en la elevación intracelular de los depósitos de PEP.

3.5 EVOLUCION DIRIGIDA DE PROTEINAS

3.5.1 Importancia en la generación de las mutantes fbr en Ingeniería Metabólica.

La Evolución Dirigida de Proteínas tiene un enorme potencial en la generación de una gran diversidad de mutantes insensibles a retroinhibición, como ha sido demostrado recientemente con ejemplos prácticos, aplicados en la ingeniería de vías metabólicas de plantas y bacterias (Wang y Liao, 2000; Cahoon y Shanklin, 2000). Asimismo, la evolución de proteínas tiene el potencial de mejorar los parámetros catalíticos de una enzima, la cual previamente pudo verse afectada negativamente en su actividad durante los procesos de mutagénesis y de selección de mutantes^{fbr}.

3.5.2 Recombinación homóloga *in vitro* (“DNA shuffling”).

La evolución natural produce diversidad genética y también explota la recombinación para seleccionar mutaciones ventajosas y eliminar las desventajosas. El “DNA shuffling” es un método de recombinación homóloga *in vitro* de genes mutantes seleccionados por fragmentación al azar y reensamblado con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Arkin A y Youvan DC, 1992). Con la técnica original de DNA shuffling (Joern, 2003; Stemmer WP, 1994a; Stemmer WP, 1994b) fue posible recombinar una gama de genes homólogos de diferentes fuentes o reunir mutaciones puntuales selectas en combinaciones nuevas. Entre otras ventajas, el “DNA shuffling” es un proceso práctico de evolución molecular dirigida, y se ha demostrado que este proceso de recombinación acelera la velocidad a la cual un gene puede evolucionar (Patten *et al.*, 1997). Actualmente, la evolución molecular dirigida está jugando un importante papel creciente en el campo de la ingeniería de proteínas (para revisiones recientes generales ver referencias: Farinas *et al.*,

2001; Taylor *et al.*, 2001; Tao y Cornish, 2002; Neylon, 2004). Recientemente, dentro de la ingeniería metabólica, se ha aplicado la evolución dirigida al mejoramiento de la producción de carotenoides en cepas de *E. coli* que han sido metabólicamente modificadas por ingeniería genética (Wang y Liao, 2000). Asimismo, enzimas de plantas de la biosíntesis de ácidos grasos se han evolucionado exitosamente en *E. coli* y expresado en plantas de *Arabidopsis* productoras de ácidos grasos (Cahoon y Shanklin, 2000). La evolución dirigida es una herramienta poderosa que puede ser aplicada al mejoramiento de la producción de compuestos conocidos, a la generación de productos naturales nuevos (Farinas *et al.*, 2001) o al mejoramiento de actividades enzimáticas limitantes dentro de una vía metabólica con la finalidad de optimizar el flujo metabólico en dicha vía.

3.6 EJEMPLOS DE TRABAJOS DE INGENIERÍA METABÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS AROMATICOS SINTETIZADOS A PARTIR DE GLUCOSA.

3.6.1 INTERMEDIARIOS DE LA VÍA DEL SHIQUIMATO

En la literatura existen relativamente pocos reportes de producción de intermediarios de la vía del SHIK, con fines de aplicación industrial, mediante el empleo de microorganismos sobreproductores modificados genéticamente. Algunos ejemplos de producción de DHQ (Draths *et al.*, 1992; Ran *et al.*, 2001), DHS (Li *et al.*, 1999; Yi *et al.*, 2003) y SHIK (Yi *et al.*, 2002; Chandran *et al.*, 2003) han sido reportados en mutantes de *E. coli* que carecen de actividades shiquimato deshidrogenasa (*aroE*⁻) y shiquimato cinasas (*aroL*⁻, *aroK*⁻).

El ácido shiquímico ha sido usado como precursor en la síntesis de quinato (Draths *et al.*, 1992; Ran *et al.*, 2001), protocatehuate (PCA) (Draths y Frost, 1994a), catecol

(Draths y Frost, 1994a), ácido gálico (Kambourakis *et al.*, 2000) y pirogalol (Kambourakis *et al.*, 2000) (Figura Z). La vía de síntesis de quinato fue establecida por sobreexpresión de la actividad deshidroquinato deshidrogenasa codificada ya sea por el gene *qad* de *Klebsiella pneumoniae* o por *aroE* de *Escherichia coli* (Draths *et al.*, 1992; Ran *et al.*, 2001). Mientras que, a partir de DHS se logró extender la vía hacia la formación de PCA mediante la introducción de la actividad DHS deshidratasa codificada por el gene *aroZ* de *K. pneumoniae* (Draths y Frost, 1994a) y subsecuentemente, mediante la introducción de la actividad PCA descarboxilasa codificada por el gene *aroY* de *K. pneumoniae*, PCA fue convertido a catecol (Draths y Frost, 1991; Draths y Frost, 1994a). El catecol puede ser transformado a ácido adípico por la actividad catecol 1,2 dioxigenasa codificada por el gene *catA* de *Acinetobacter calcoaceticus* (Niu *et al.*, 2002). Por otro lado, fue demostrado que el PCA también puede ser convertido a ácido gálico (GA) por la actividad del producto del gene *pobA** que codifica para la enzima mutante p-hidroxibenzoato hidroxilasa de *Pseudomonas aeruginosa* (Kambourakis *et al.*, 2000). Esta vía puede ser extendida aún más por la actividad PCA descarboxilasa que convierte el GA a pirogalol (Kambourakis *et al.*, 2000) (Figura 1). Estos ejemplos muestran claramente el potencial para la producción de compuestos con aplicación industrial que tiene la vía de SHIK.

3.6.2 FENILALANINA

Varios trabajos relacionados al mejoramiento en la producción de L-Phe han sido reportados. Así por ejemplo: Miller *et al.* (1987) evaluaron la estrategia de inactivación de la PEP carboxilasa en cepas de *E. coli* productoras de L-Phe que sobre-expresan simultáneamente DAHP sintasa y CM-PDT^{fbr} (*aroF*, *pheA*^{fbr}). El $Y_{Phe/Glc}$ alcanzado en la mutante *ppc*⁻ fue de 0.04 g/g correspondiendo al 5% del $Y_{Phe/Glc}$ máximo teórico. Forberg *et*

al., (1988) han reportaron un $Y_{Phe/Glc}$ de 0.27 g/g correspondiendo al 50% del $Y_{Phe/Glc}$ máximo teórico en cepas sobre-expresando conjuntamente $aroF^{fbr}$ y $pheA^{fbr}$. Por otro lado Tartako y Romeo encontraron que la inactivación del gene $csrA$, que codifica para el regulador global de almacenamiento de carbono, aumenta significativamente el flujo del metabolismo central carbono hacia la biosíntesis de L-Phe en cepas co-expresando simultáneamente $aroG^{fbr}$, $tktA$ y $pheA^{fbr}$. Presumiblemente, este hecho ocurre debido a que el gene $csrA$ regula negativamente a los genes de la PEP sintasa (pps) y PEP carboxinasa ($pckA$), mientras que regula positivamente a la piruvato cinasa F ($pyk F$) (Tartako y Romeo, 2001). Un $Y_{Phe/Glc}$ de 0.43 g/g fue reportado en este último trabajo, en el que se empleó una concentración de glucosa de 0.5 g/l. Sin embargo, el $Y_{Phe/Glc}$ disminuyó a 0.13 g/g cuando se empleó una concentración de glucosa de 10 g/l. Por consiguiente, cabe señalar que el alto $Y_{Phe/Glc}$ reportado es, principalmente, una consecuencia de la baja concentración de glucosa más que de un efecto de la mutación $csrA$.

En varios trabajos se ha evaluado la estrategia de inactivación del PTS para determinar su efecto sobre mejoramiento del rendimiento de compuestos aromáticos sintetizados a partir de glucosa en *E. coli* (Gosset *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Báez *et al.*, 2001, Yi *et al.*, 2003; Chandran *et al.*, 2003). Chen y colaboradores evaluaron por primera vez el efecto de la inactivación del PTS sobre la biosíntesis de L-Phe a partir de glucosa (Chen *et al.*, 1997). En este trabajo se reportó el uso de una mutante de *Escherichia coli* PTS⁻ (PP316) portando plásmidos que co-expresan $aroF^{fbr}$ y $pheA^{fbr}$. Sin embargo, los resultados de este trabajo fueron poco afortunados, ya que de acuerdo con la hipótesis y contrario a lo esperado, PP316 produjo mucho menos L-Phe que una cepa isogénica PTS⁺. La explicación a este hecho dada por los autores es que la mutante PP316 tuvo un flujo más

alto a través de las piruvato cinasas y TCA, causando bajos niveles intracelulares de PEP. En fuerte contraste, otros trabajos sugieren que la inactivación del PTS puede incrementar significativamente el flujo de carbono hacia la vía del SHIK (Gosset *et al.*, 1996; Báez *et al.*, 2001). El incremento en el flujo de carbono fue determinado al medir el primer intermediario (DAHP) de la vía del SHIK, en mutantes $\text{PTS}^{-}\text{Glc}^{+}$ bloqueadas en el gene *aroB* que co-expresan *aroG^{fb}* y *tktA*, alcanzándose rendimientos absolutos de DAHP a partir de glucosa que corresponden al 83% del máximo teórico (Báez *et al.*, 2001). Este efecto positivo debido a la inactivación del PTS determinado en estos últimos trabajos, sugiere que esta mejora significativa en el rendimiento de DAHP puede ser extendida al rendimiento de la síntesis de amino ácidos aromáticos, tales como L-Phe. Bajo este escenario, el reto consiste en poder dirigir todo ese incremento de carbono determinado en forma de DAHP hasta la síntesis de L-Phe.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Estudiar el efecto de la inactivación del Sistema de Transporte Fosfotransferasa (PTS) y la sobreexpresión de diferentes versiones resistentes a retroinhibición de CM-PDT sobre el rendimiento y productividad en cepas de *Escherichia coli*, que sobreexpresan simultáneamente DAHP sintasa resistente a retroinhibición y transcetolasa.

4.2 Objetivos específicos:

1. Generar una mutante CM-PDT insensible a retroinhibición por L-Phe (*pheA^{fbr}*) y clonarlo bajo el control del promotor *trc* en el vector pTrc99A para generar el plásmido pTrcpheA^{fbr}.
2. Construir el plásmido pJLBaroG^{fbr}, el cual porta el gene que codifica para la DAHP sintasa insensible a retroinhibición por L-Phe.
3. Construir las cepas sobreproductoras de L-Phe empleando las cepas JM101(PTS⁺), PB12 (PTS⁻Glc⁺) y PB13 (PTS⁻Glc⁺) como hospederos: transformación con tres plásmidos que codifican para la DAHP sintasa (pJLBaroG^{fbr}), transcetolasa (pCL^{tk}) y diferentes versiones de CM-PDT (pTrcpheA^{fbr} ó pTrcpheA^{ev1} ó pTrcpheA^{ev2}).
4. Cultivar las cepas diseñadas para sobreproducción de L-Phe utilizando un sistema de células en reposo en matraces conteniendo medio mínimo M9, adicionado con glucosa (10g/L) como única fuente de carbono.

Objetivos generales y específicos

5. Evaluar la máxima capacidad de síntesis en las cepas sobreproductoras en términos de rendimientos y productividades de L-Phe y determinar los efectos de la inactivación del PTS y de las versiones de CM-PDT.

6. Determinar los pasos enzimáticos limitantes en la biosíntesis de L-Phe en las cepas construidas.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 PLASMIDOS

Todos los plásmidos utilizados en este estudio están descritos en la tabla II. El plásmido pCL*tkt* (Draths *et al.*, 1992) contiene el gene *tktA* que codifica para la transcetolasa A y el pJLBaro*G^{fbr}* fueron usados para la construcción de las cepas sobreproductoras de L-Phe.

5.1.1 Construcción del plásmido pJLBaro*G^{fbr}*

El plásmido pJLBaro*G^{fbr}* fue construido ligando el fragmento de 6.4 kb conteniendo el gene *aroG^{fbr}* derivado de una doble digestión del plásmido pRW300 (Gosset *et al.*, 1996) con las enzimas *DraI* y *BsrZ17I* con el fragmento de 1.1 kb originado de la doble digestión del pACYC184 con *EcoRV* y *PvuII*. El producto de la mezcla de ligación se utilizó para transformar por electroporación la triple mutante AB3248 (*aroF⁻*, *aroG⁻*, *aroH⁻*) (Wallace y Pittard, 1967). Las células AB3248 transformadas fueron lavadas dos veces con solución isotónica (NaCl 0.9%) y seleccionadas por complementación de la actividad DAHP sintasa en la mutante AB3248, plateando en cajas de medio-ARO adicionadas con Tc (30µg/ml). Un plásmido de 7.5 kb proveniente de las células transformadas fue purificado y verificado por patrones de restricción para su correcta construcción, el cual fue designado pJLBaro*G^{fbr}*. Este plásmido porta el gene *aroG^{fbr}* bajo el control del promotor *lacUV5* y codifica para la actividad DAHP sintasa, esta enzima tiene una mutación puntual, Ser₂₁₁Phe, que la hace insensible a retroinhibición (*fbr*) por Phe. Asimismo, este plásmido porta los genes *lacI* y *tet*, que codifican para el represor de lactosa y la resistencia al antibiótico tetraciclina, respectivamente.

5.1.2 Construcción de los plásmidos pTrcpheA^{br}, pTrcpheA^{ev1} y pTrcpheA^{ev2}

Una versión truncada de CM-PDT fue construida por delección de los aminoácidos 304-386 de la enzima (Figura 6). Esta región corresponde al dominio-R de la CM-PDT que es codificada por gene *pheA*. Esta delección fue generada por técnicas de PCR, empleando como templado DNA cromosomal de *E. coli* K-12 y oligonucleótidos diseñados específicamente para el truncamiento del gene *pheA*. El oligo directo: 5' CAACACCATGGCATCGGAAAAC 3' contiene un sitio *NcoI* mientras que el oligo reverso: 5' CCCCAAGCTTTCGGCACCTTTTCATCAG 3' contiene un sitio *HindIII* para facilitar el clonado producto de PCR, designado como *pheA^{br}*, bajo el promotor *trc* en el vector pTrc99A para generar el plásmido pTrcpheA^{br} (Figura 6). Así, el gene *pheA^{br}* resultante codifica para una enzima de 303 amino ácidos resistente a retro-inhibición (CM-PDT^{br}). Esta CM-PDT^{br} es tres aminoácidos más grande que otra CM-PDT reportada previamente por Zhang *et al.* (1998) designada como P*300. Los parámetros catalíticos de la P*300 fueron evaluados y se demostró que la enzima retiene las actividades CM-PDT y que la retroinhibición causada por Phe fue eliminada (Zhang *et al.*, 1998). Sin embargo, el truncamiento del dominio R en P*300 disminuyó la afinidad de CM por CHO y de PDT por PPA, resultando en un decremento de la eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m) de 3 veces para CM y de 1.7 veces para la PDT. Estos resultados sugieren fuertemente, por similitud de tamaño entre CM-PDT^{br} y P*300, que las actividades en la CM-PDT^{br} estarán afectadas en igual proporción. Adicionalmente a este hecho, experimentos de complementación de una doble mutante de *Escherichia coli tyrA⁻ pheA⁻* fueron realizados con el plásmido pTrcpheA^{br} en medio selectivo, observándose que la complementación fue lenta ya que el crecimiento de colonias ocurrió en 48 horas (Osuna *et al.*, datos por publicar). Esta observación también apoya el detrimento de las propiedades catalíticas en la CM-PDT^{br}.

Con el objeto de contender con esta desventaja, se planteó la estrategia de realizar evolución dirigida de proteínas a la CM-PDT^{fab} para revertir los efectos negativos causados en los parámetros catalíticos de la enzima. El trabajo de evolución dirigida de la CM-PDT^{fab} fue llevado a cabo en colaboración con el grupo de Ingeniería de Proteínas (Osuna *et al.*, datos por publicar) de acuerdo por el método descrito por Stemmer (1994). Dos ciclos evolucionarios fueron realizados para seleccionar los dos genes mutantes *pheA*^{ev1} y *pheA*^{ev2} por la habilidad de restaurar el crecimiento de la doble mutante de *Escherichia coli* *tyrA*⁻ *pheA*⁻. El gene evolucionado *pheA*^{ev1} proviene del primer ciclo, mientras que *pheA*^{ev2} proviene del segundo (Figura 6). Aparentemente, el gene *pheA*^{ev2} complementa mejor a la mutante de *Escherichia coli* *tyrA*⁻ *pheA*⁻, ya que las colonias transformadas con el plásmido que porta este gene crecen más rápido (datos no mostrados). La secuencia de DNA de estos genes *pheA*^{ev1} y *pheA*^{ev2} evolucionados fue determinada. La variante *pheA*^{ev1} no presentó mutaciones en el dominio CM mientras que en el dominio PDT fueron encontradas dos sustituciones de aminoácidos: Thr259Ser y Tyr230Leu. Por otro lado, en la variante *pheA*^{ev2}, cuatro sustituciones dentro del dominio CM fueron encontradas: Asn5Ser, Leu8Pro, Asp54Asn y Leu55Met mientras que solamente se encontró una sustitución en el dominio PDT: Ser235Ala. Estos genes evolucionados también fueron clonados el vector pTrc99A y colocados bajo el control del promotor *trc*, para generar los plásmidos pTrc*pheA*^{ev1} y pTrc*pheA*^{ev2}. La purificación y la caracterización cinética de las CM-PDT evolucionadas, se encuentra actualmente en estudio (Osuna *et al.*, datos por publicar).

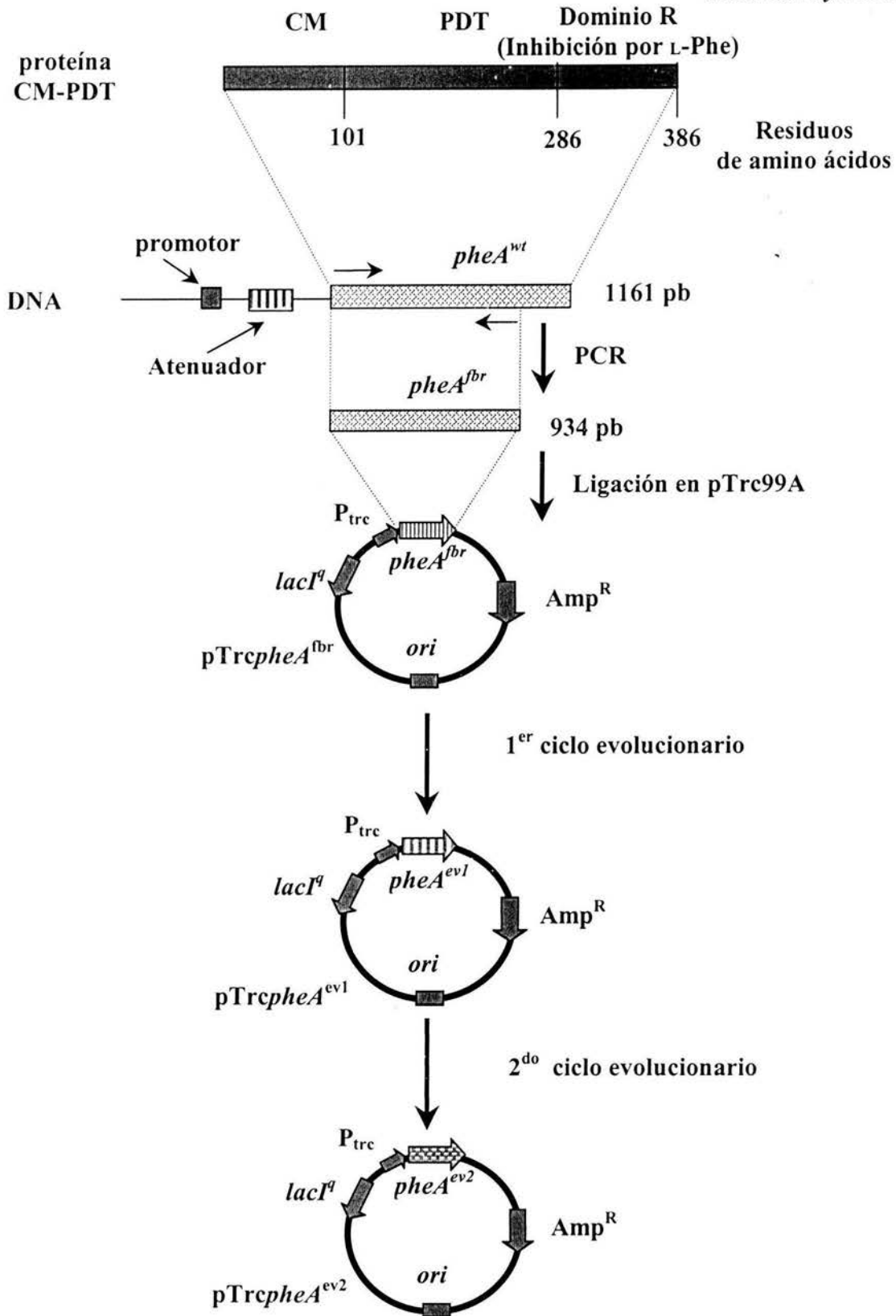


Figura 6. Esquema de construcción de las versiones insensibles a retroinhibición del gene *pheA* (*pheA*^{fbr}, *pheA*^{ev1}, *pheA*^{ev2}).

5.2 CEPAS

Todas las cepas usadas en este trabajo están descritas en la tabla II. El microorganismo hospedero utilizado para la construcción de las cepas sobreproductoras de L-Phe fue *Escherichia coli* JM101 (PTS⁺) y sus derivadas PB12 y PB13 (PTS⁻Glc⁺). *Escherichia coli* JM101 es la cepa progenitora de la mutante PB11, en la cual el operón PTS (*ptsHI, ccr*) fue escindido, y en consecuencia, su capacidad de transporte y de consumo de glucosa disminuyó dramáticamente. A partir de la mutante PB11, otras mutantes designadas PB12 y PB13 fueron seleccionadas como revertantes del fenotipo PTS⁻Glc⁺ mediante cultivos continuos por la habilidad de crecer rápido utilizando glucosa como única fuente de carbono (Flores *et al.*, 1996). PB12 y PB13 han sido caracterizadas fisiológicamente mostrando diferentes velocidades específicas de crecimiento, capacidades de transporte de glucosa, y de consumo de glucosa (Flores *et al.*, 2002).

5.2.1 Construcción de las cepas de *Escherichia coli* modificadas por Ingeniería genética e Ingeniería de proteínas.

JM101, PB12 y PB13 fueron transformadas por electroporación con los plásmidos que codifican para la DAHPS^{fbr} y transcetolasa (pJLBaroG^{fbr}, pCLtk) y seleccionadas en cajas de Luria-Bertani adicionadas con los antibióticos adecuados, tetraciclina (30 µg/ml) y estreptomycinina (30 µg/ml), respectivamente. Posteriormente, fueron transformadas con un tercer plásmido que codifica para una versión de la CM-PDT, ya sea pTrcpheA^{fbr} ó pTrcpheA^{ev1} ó pTrcpheA^{ev2}. Se generaron un total de 9 combinaciones posibles y son mostradas en la tabla II.

Tabla II. Plásmidos, cepas y cepas modificadas por ingeniería genética y evolución de proteínas.

CEPAS	CARACTERISTICAS RELEVANTES	REFERENCIAS
JM101	<i>supE</i> , <i>thi</i> , $\Delta(lac-proAB)$, F'	Bolívar <i>et al.</i> , 1977
PB12	As JM101 but <i>ptsHI</i> ⁻ , <i>err</i> ⁻ y Glc ⁺	Flores <i>et al.</i> , 1996
AB3248	<i>aroF363 aroG365 aroH367 proA2 argE3 elv-7 his-4 lac gal-2 tsx-358 thi</i>	Wallace y Pittard, 1967
PLASMIDOS		
pRW300	<i>aroG</i> ^{br} bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> , porta genes <i>lacI</i> ^A y <i>tet</i> . Origen de replicación de pBR322.	Bolívar <i>et al.</i> , 1977 Gosset <i>et al.</i> , 1996
pCL <i>tkt</i>	<i>tktA</i> (proviene del replicón pCL1920, resistente a estreptomycinina o espectinomycinina).	Draths <i>et al.</i> , 1992
pACYC184	Tc ^R , Cm ^R , vector de clonación.	Rose, 1988
pJLBaro <i>G</i> ^{br}	<i>aroG</i> ^{br} bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> , porta los genes <i>lacI</i> ^A y <i>tet</i> . Origen de replicación de pACYC184.	Este estudio
pTrc99A	Vector de clonación con promotor <i>lacUV5</i> , porta los genes <i>bla</i> (Ap ^R) y <i>lacI</i> ^A . Origen de replicación de pBR322.	Amann <i>et al.</i> , 1988
pTrc <i>pheA</i> ^{br}	Gene truncado <i>pheA</i> ^{br} bajo el control del promotor <i>trc</i> . El superíndice ^{br} significa resistente a retro-inhibición.	Este estudio
pTrc <i>pheA</i> ^{ev1}	Gene <i>pheA</i> ^{ev1} evolucionado bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> . El superíndice ^{ev1} significa 1 ^{ra} versión evolucionada derivada del gene truncado <i>pheA</i> ^{br} .	Osuna <i>et al.</i> , datos por publicar
pTrc <i>pheA</i> ^{ev2}	Gene <i>pheA</i> ^{ev2} evolucionado bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> . El superíndice ^{ev2} significa 2 ^{da} versión evolucionada derivada del gene truncado <i>pheA</i> ^{br} .	Osuna <i>et al.</i> , datos por publicar
CEPAS MODIFICADAS POR INGENIERIA GENETICA Y EVOLUCION DE PROTEINAS		
JM101-fbr	JM101 transformada con pJLBaro <i>G</i> ^{br} , pCL <i>tkt</i> y pTrc <i>pheA</i> ^{br}	Este estudio
JM101-ev1	JM101 transformada con pJLBaro <i>G</i> ^{br} , pCL <i>tkt</i> y pTrc <i>pheA</i> ^{ev1}	Este estudio
JM101-ev2	JM101 transformada con pJLBaro <i>G</i> ^{br} , pCL <i>tkt</i> y pTrc <i>pheA</i> ^{ev2}	Este estudio
PB12-fbr	PB12 transformada con pJLBaro <i>G</i> ^{br} , pCL <i>tkt</i> y pTrc <i>pheA</i> ^{br}	Este estudio
PB12-ev1	PB12 transformada con pJLBaro <i>G</i> ^{br} , pCL <i>tkt</i> y pTrc <i>pheA</i> ^{ev1}	Este estudio
PB12-ev2	PB12 transformada con pJLBaro <i>G</i> ^{br} , pCL <i>tkt</i> y pTrc <i>pheA</i> ^{ev2}	Este estudio
PB13-fbr	PB13 transformada con pJLBaro <i>G</i> ^{br} , pCL <i>tkt</i> y pTrc <i>pheA</i> ^{br}	Este estudio
PB13-ev1	PB13 transformada con pJLBaro <i>G</i> ^{br} , pCL <i>tkt</i> y pTrc <i>pheA</i> ^{ev1}	Este estudio
PB13-ev2	PB13 transformada con pJLBaro <i>G</i> ^{br} , pCL <i>tkt</i> y pTrc <i>pheA</i> ^{ev2}	Este estudio

5.3 Medios de cultivo

5.3.1 Medio mínimo M9 modificado

El medio cultivo utilizado para el estudio de células en reposo fue medio mínimo M9 modificado. Se prepararon sales 5X del medio M9 cuya composición química fue la siguiente: 211 mM Na₂HPO₄, 42.8 mM NaCl, 110 mM KH₂PO₄, 74.7 mM NH₄Cl. Los

siguientes compuestos fueron añadidos a las solución de sales M9 1X para obtener las concentraciones finales de 1 mM MgSO₄, 50 μM CaCl₂ y 0.3 μM vitamina B1, 100 μM IPTG y 1 ml/l de solución de elementos traza conteniendo 0.1 g/l CaCl₂ · 2H₂O, 0.02 g/L de CuCl₂ · 5H₂O, 0.1 g/L de CoCl₂ · 6H₂O, 0.2 g/L de FeSO₄ · 7H₂O, 0.1 g/L de MnSO₄ · 5H₂O, 0.1 g/L de ZnSO₄ · 7H₂O y 0.01 g/L de Na₂MoO₄ · 2H₂O. El pH del medio fue ajustado a 7.0. Se adicionó glucosa a una concentración de 10 g/l.

5.3.2 Medio ARO

El medio ARO tiene la misma composición del medio mínimo M9, pero además contiene ácido 2-3 dihidrobenzoico (35 mg/l), ácido *p*-hidroxibenzoico (48 mg/l) y ácido *p*-aminobenzoico (62 mg/l).

5.4 Condiciones de cultivo

Cepas. Todas las cepas utilizadas fueron almacenadas en crioviales a -70 °C, conteniendo medio Luria-Bertani con glicerol al 50%. *Preinóculos.* A partir de los crioviales se tomaron azadas de colonias para la preparación del preinóculo, los cuales fueron realizados en medio mínimo M9 más extracto de levadura (5 g/l). Se añadieron los antibióticos adecuados para el mantenimiento de los plásmidos: tetraciclina (30 μg/l), estreptomicina (30 μg/l) y ampicilina (100 μg/l). IPTG fue adicionado a una concentración de 100 μM. Los preinóculos fueron incubados durante la noche a 37 °C y 250 rpm.

Inóculos. Al día siguiente los preinóculos fueron subcultivados en matraces bafleados conteniendo 50 ml del mismo medio y fueron cosechados por centrifugación (a 7000 rpm y 4 °C) cuando las células alcanzaron una densidad óptica de 2 (600 nm). A

continuación, éstas fueron lavadas dos veces con medio M9 modificado y usadas como inóculo para los “resting cells”.

Resting cells. También conocidos como cultivos de células en reposo son utilizados como un primer acercamiento en la evaluación de rendimientos y productividades en cepas sobreproductoras de algún metabolito de interés. Estos sistemas han sido ampliamente utilizados en la literatura (Patnaik y Liao, 1994; Weikert y col., 1998). Entre las ventajas que ofrecen este tipo de cultivos está el de poder evaluar una gran cantidad de mutantes en menor tiempo y costo comparado con los cultivos en biorreactores. De esta forma, utilizando los cultivos en reposo es posible seleccionar las mejores productoras del metabolito de interés y continuar los estudios de rendimientos y producción del metabolito a nivel de biorreactor. Asimismo, los cultivos en reposo permiten evaluar la máxima capacidad celular de conversión del sustrato al producto. Esto es logrado al eliminar la competencia por precursores que son dirigidos hacia la síntesis de biomasa. El cese en la síntesis celular puede lograrse al cambiar drásticamente el medio de cultivo, por ejemplo el cambio de medio rico a medio mínimo puede lograr este efecto por algunas horas. De igual manera, la adición de antibióticos tales como el cloramfenicol, que bloquean la síntesis celular pueden lograr el mismo efecto (Weikert y col., 1998) o la combinación de ambas estrategias. Así es posible direccionar un mayor flujo de carbono hacia la síntesis del producto deseado. Forberg y col. (1988) demostraron experimentalmente que los rendimientos máximos teóricos sólo pueden ser alcanzados en condiciones de no-crecimiento (fase estacionaria). Teóricamente, los cultivos en reposo simulan condiciones de fase estacionaria. Las células utilizadas en el presente estudio como inóculo fueron cultivadas en medio rico (ver inóculos), cosechadas en fase exponencial, y por consiguiente, están en estado fisiológico activo. Al resuspender estas células en matraces

bafleados conteniendo 50 ml de medio mínimo M9, el crecimiento celular fue detenido por el cambio drástico a medio mínimo y por la adición de cloramfenicol a una concentración de 50 µg/ml. No se adicionaron otros antibióticos al sistema de “resting cells”.

5.5 Métodos analíticos

Muestras de 1.5 ml fueron tomadas periódicamente durante un periodo de 10 horas de los cultivos de células en reposo. La densidad óptica (absorbancia a 600 nm) se midió usando un espectrofotómetro (Beckman DU-70), y el peso seco se calculó multiplicando la absorbancia por un coeficiente de 0.45 g/l, determinado previamente de una curva de peso seco. Las muestras colectadas fueron centrifugadas, el sobrenadante fue colectado para realizar análisis de los principales productos, intermediarios y subproductos generados en estos cultivos.

D-Glucosa, L-Phe, L-Tyr, L-Trp, DAHP, DHS, SHIK y CHO fueron determinados en sistema de HPLC (bomba cuaternaria 600E, inyector automático 717, índice de refracción 2410 y detector de arreglo de fotodiodos 996, Waters Co., USA). Para la determinación de D-Glucosa, DAHP, DHS, SHIK, de los ácidos fórmico, acético, propiónico, butírico y láctico, se empleó una columna Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm; 9 µm)(Bio Rad, CA, USA). Las condiciones de corrida fueron: fase móvil 5 mM H₂SO₄; flujo 0.5 ml/min y temperatura, 50°C. Bajo estas condiciones, D-glucosa y ácido acético fueron determinados por índice de refracción, mientras que los otros metabolitos fueron identificados por arreglo de fotodiodos a 210 nm. Por otro lado, para la determinación de L-Phe, L-Tyr, L-Trp y CHO se utilizó una columna C-18 Supelco Discovery (250 x 4.6 mm, 5 µm) (Sigma, St. Louis MO, USA). Las condiciones de corrida fueron: fase móvil, 0.2%

ácido trifluoroacético en 40% metanol; flujo 0.5 ml/min. La detección fue realizada por arreglo de fotodiodos a 220 nm para L-Phe y 280 nm para los demás metabolitos. Asimismo, un método alternativo para determinación de la concentración DAHP por el ensayo tiobarbitúrico fue empleado (Srinivasan y Sprinson, 1959).

6 RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Sistema de cultivo de células en reposo “resting cells”.

En cultivos preeliminares (datos no mostrados) se observó que el estado fisiológico de las células que fueron utilizadas como inóculo es de gran importancia, ya que el rendimiento y la productividad se ven directamente afectadas por el estado metabólico de la célula. Por esta razón, se eligieron las condiciones de cultivo en las cuales las células que se utilizaron estaban metabólicamente activas, ya que provienen de cultivos preparados en medio mínimo M9 modificado y enriquecido con extracto de levadura (ver Materiales y Métodos) y creciendo en fase exponencial. Con estas células se inocularon matraces bafleados de 250 ml, conteniendo 50 ml de medio mínimo M9 modificado y adicionado con glucosa (10 g/L) como única fuente de carbono e IPTG a una concentración de 100 μ M para inducir la expresión de los genes *aroG^{fbr}* y las versiones de *pheA*. Además, se añadió cloramfenicol (100 μ g/ml) para detener el crecimiento celular (ver Materiales y Métodos). Bajo estas condiciones de no-crecimiento, las nueve cepas generadas JM101-fbr, JM101-ev1, JM101-ev2, PB12-fbr, PB12-ev1, PB12-ev2 PB13-fbr, PB13-ev1 y PB13-ev2 fueron evaluadas (tabla II).

Este sistema de cultivo de células en reposo es conocido en la literatura como “resting cells”, y fue elegido para evaluar la máxima capacidad de biosíntesis de L-Phe de las cepas modificadas, ya que en estas condiciones de no-crecimiento, la producción de biomasa es reducida completamente. De esta forma, la competencia por los precursores que son conducidos hacia la síntesis de biomasa es eliminada, aumentando así la capacidad de biosíntesis de L-Phe. (ver Materiales y Métodos). El medio mínimo M9 adicionado con glucosa como única fuente de carbono se escogió para determinar los $Y_{Phe/Glc}$. Al menos,

fueron realizados tres experimentos independientes por cada cepa, y cada experimento se llevó a cabo por duplicado. De esta forma, todos los valores que son reportados a continuación representan los valores promedio de al menos 6 muestras. La diferencia entre las concentraciones de los metabolitos medidos en los experimentos independientes siempre estuvo en el intervalo de 1-10% (ver sección 6.2).

La concentración celular inicial en los cultivos en reposo se ajustó a una densidad óptica de 2.2 (a 600 nm), que corresponde a 1 ± 0.1 g de biomasa/l (Figura 7). Estos matraces fueron incubados y agitados a 37 °C y 250 rpm, tomando muestras periódicamente de 1.5 ml, cada hora durante un lapso total de 10 horas, que fue el tiempo de duración de los cultivos en reposo. El monitoreo de la biomasa es mostrado en la Figura 7, observándose que ésta se mantuvo constante en todas las cepas durante todo el cultivo. De esta forma, la competencia por los precursores metabólicos que son dirigidos hacia la síntesis de biomasa fue eliminada, favoreciendo así la síntesis de L-Phe.

La biomasa fue removida de las muestras por centrifugación y los sobrenadantes fueron colectados por decantación y filtrados para ser analizados por HPLC. En la Figura 8 se muestra el perfil de consumo de glucosa (glucosa remanente), reportada en g/l. En general, se observó que la velocidad de consumo volumétrico se mantuvo relativamente constante en todas las cepas, en donde los datos se ajustaron a ecuaciones lineales con buenos coeficientes de correlación ($R^2=0.98$)(datos no mostrados). A simple vista, se aprecia que las tres cepas JM101 consumen glucosa más rápidamente que las cepas derivadas de PB12 y PB13. Las velocidades específicas de consumo de glucosa (q_{Glc}) fueron calculadas a partir de los datos de glucosa remanente y de concentración celular (Figura 9) de acuerdo con la ecuación: $q_{Glc} = \Delta Glc / (\Delta t * X_{prom})$, en donde ΔGlc es el

cambio de concentración de glucosa, Δt es el cambio en el tiempo y X_{prom} es la biomasa promedio entre dos puntos. En vista de que, la biomasa y el consumo volumétrico de glucosa permanecieron relativamente constantes, consecuentemente, la q_{Glc} en todas las cepas también se mantuvo constante a lo largo de todo el cultivo (datos no mostrados). La Figura 9 muestra el valor promedio de la q_{Glc} a lo largo del cultivo en todas las cepas, observándose que en todas las cepas PTS^+ JM101-fbr, JM101-ev1 y JM101-ev2, la q_{Glc} tuvo valores similares de 0.17 ± 0.01 g/g-peso-seco \cdot h, mientras que en todas las mutantes PTS^-Glc^+ , las q_{Glc} alcanzadas fueron significativamente más bajas, en el intervalo de 0.09 ± 0.008 a 0.12 ± 0.01 g/g-peso-seco \cdot h (Figura 9), excepto para la mutante PB13-ev2 en donde la q_{Glc} fue ligeramente mayor, alcanzando 0.142 ± 0.008 g/g-peso-seco \cdot h. Este decremento significativo de la q_{Glc} en las mutantes PTS^-Glc^+ varía entre 30 a 47 % comparado con sus contrapartes PTS^+ . En estudios previos en nuestro laboratorio (Báez *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2002), se reportó un decremento de 42 % de la capacidad de transporte de glucosa de la mutantes PTS^-Glc^+ con respecto a las cepas PTS^+ . Este hecho es congruente con la q_{Glc} medida en las mutantes PTS^-Glc^+ , lo cual sugiere que, el sistema alternativo de transporte GalP-Glk que reemplazó al PTS en las cepas PTS^-Glc^+ de la cepa progenitora JM101, no es suficiente para lograr el nivel de transporte de glucosa comparable con una cepa PTS^+ . La proteína simportadora de D-galactosa- H^+ , GalP, tiene especificidad para transportar activamente hexosas, con baja afinidad ($K_m = 5 \mu M$). Sin embargo, considerando las condiciones de alta concentración de glucosa empleadas en estos cultivos, no sería aventurado pensar que el decremento medido en el transporte en las mutantes PTS^-Glc^+ puede deberse a que la expresión del gene *galP* no provee una cantidad suficiente de

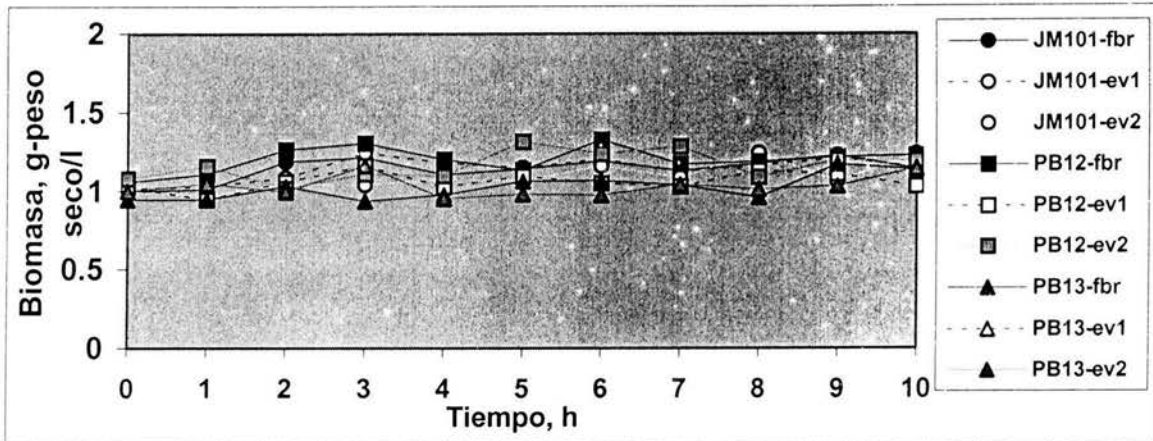


Figura 7. Concentración celular (g/l) de los cultivos en reposo ó “resting cells”.

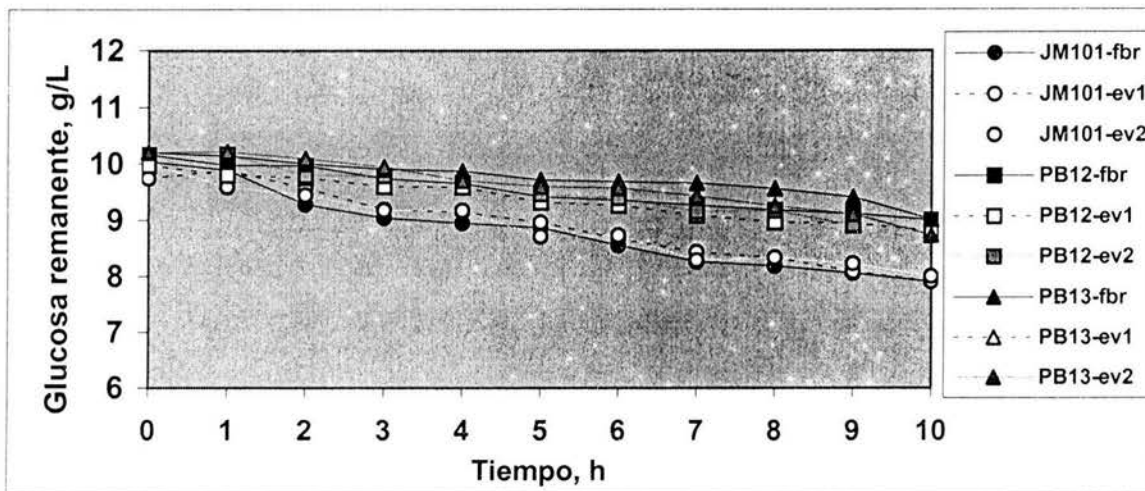


Figura 8. Cinética de consumo volumétrico de glucosa, reportada como g/l.

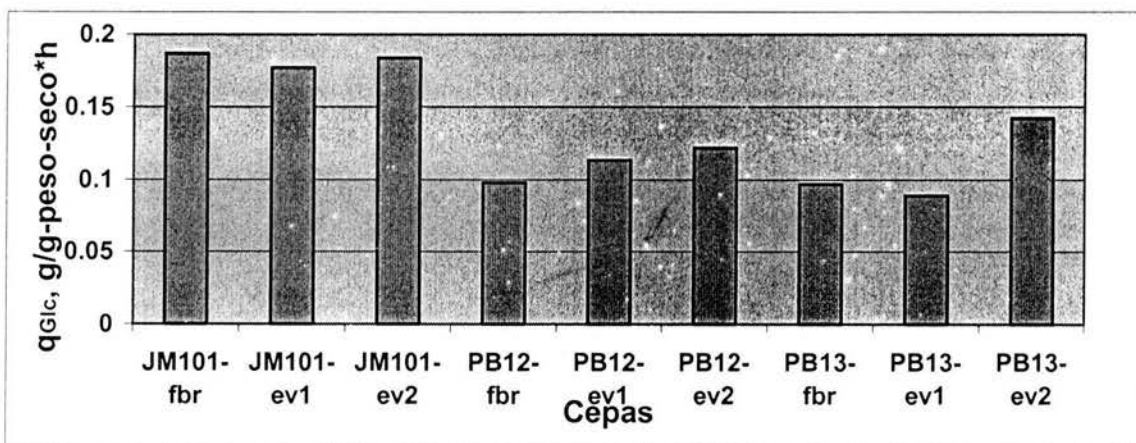


Figura 9. Promedio de las velocidades específicas de consumo de glucosa (q_{Glc}) a lo largo de los cultivos reportadas en g/g-peso-seco*h.

la proteína GalP para que la glucosa pueda ser transportada a una velocidad similar a la observada en una cepa con el sistema PTS activo.

6.2 Acumulación de intermediarios aromáticos

Los análisis por HPLC para detectar intermediarios de la vía del SHIK en los sobrenadantes, revelaron la presencia de concentraciones significativas de DHS, SHIK y CHO, los cuales constituyen los picos más prominentes de los cromatogramas de las muestras (datos no mostrados). La Figura 10 describe la cinética de producción de DHS, apreciándose que el DHS es acumulado de manera constante durante el transcurso de los cultivos en todas las cepas. Los datos de producción de DHS pueden ajustarse a ecuaciones lineales con buenos coeficientes de correlación ($R^2=0.999$). Las concentraciones más altas de DHS fueron detectadas en el fondo genético PTS^-Glc^+ , alcanzando niveles de 0.114 ± 0.011 y 0.129 ± 0.012 g/l en las cepas PB12-fbr y PB13-fbr, respectivamente. Niveles significativamente menores de DHS de 0.054 ± 0.005 , 0.047 ± 0.003 y 0.058 ± 0.005 g/l fueron acumulados por las cepas PB12-ev2, PB13-ev1 y PB13-ev1, respectivamente; mientras que, niveles aún menores de DHS fueron acumulados en el fondo genético PTS^+ , los cuales estuvieron en el intervalo de 0.009 ± 0.001 - 0.018 ± 0.001 g/l. Estos resultados sugieren fuertemente que la inactivación y remplazamiento del PTS por el sistema GalP-Glk tiene un efecto relevante en la acumulación de DHS. Como se mencionó previamente este efecto es debido a una mayor disponibilidad metabólica del precursor PEP en las cepas PTS^-Glc^+ que utilizan ATP en lugar de PEP para fosforilar la glucosa entrante. Por lo tanto, esta mayor acumulación de DHS puede ser el reflejo de que el flujo de carbono que es canalizado hacia la vía del SHIK en las mutantes PTS^-Glc^+ es mayor que en el fondo PTS^+ .

La acumulación y secreción de intermediarios de la vía del SHIK es la consecuencia de una limitación en las enzimas que los consumen (Dell y Frost, 1993). Este hecho puede ser demostrado ya que cuando se sobreexpresa el gene que codifica la enzima limitante se elimina la acumulación y secreción de metabolitos intermediarios (Dell y Frost, 1993).. Una cepa de *E. coli* no modificada genéticamente, no secreta intermediarios aromáticos. Sin embargo, si se introduce y expresa un gene que incrementa significativamente el flujo de carbono hacia la vía del SHIK, entonces se genera un nuevo escenario metabólico en el cual algunas enzimas pueden llegar a ser limitantes de velocidad. Así, en las cepas utilizadas en este estudio, la expresión del gene *aroG^{fbr}* y la síntesis de su producto AroG^{fbr} ocasionan un incremento dramático en el flujo de carbono hacia la vía del SHIK, causando a su vez la acumulación de intermediarios en todas las cepas. La acumulación de DHS ocurre debido a que el flujo de carbono excede la capacidad de la enzima 3-deshidroshiquimato deshidrogenasa. Sin embargo, este efecto es aún más marcado en las mutantes PTS⁻Glc⁺, ya que al tener éstas un mayor potencial de canalizar un flujo más alto de carbono hacia la vía del SHIK, se genera una mayor limitación enzimática de la 3-deshidroshiquimato deshidrogenasa (*aroE*) y por tanto una mayor acumulación de DHS.

Por otro lado, al evaluar el efecto de la expresión de las diferentes versiones del gene *pheA* sobre la acumulación de DHS, no se observó ningún efecto en el fondo genético PTS⁺. Sin embargo, en el fondo genético PTS⁻Glc⁺, la expresión del gene truncado *pheA^{fbr}* en las mutantes PB12-fbr y PB13-fbr, aparentemente, sí tiene un efecto marcado sobre la acumulación de DHS cuando se comparan con las mutantes que expresan las versiones evolucionadas de *pheA*, ya que en éstas los niveles de DHS disminuyeron significativamente por razones aún desconocidas.

En la Figura 11 se muestra la cinética de producción de SHIK, observándose un comportamiento similar al del intermediario DHS, ya que también SHIK siguió un perfil de acumulación lineal en todas las cepas evaluadas. Análogamente, en las mutantes $\text{PTS}^- \text{Glc}^+$ que expresan el gene truncado *pheA^{fbr}* (PB12-fbr y PB13-fbr) se acumularon los niveles más altos de SHIK, alcanzando concentraciones de 0.081 ± 0.007 y 0.070 ± 0.006 g/l; mientras que en todas las cepas restantes que expresan las versiones evolucionadas (*pheA^{ev1}* y *pheA^{ev2}*) se alcanzaron niveles significativamente menores de SHIK. Por ejemplo, JM101-fbr, JM101-ev1, JM101-ev2, PB12-ev2, PB13-ev2 acumularon niveles similares de SHIK de 0.022 ± 0.001 , 0.029 ± 0.002 , 0.029 ± 0.002 , 0.034 ± 0.003 y 0.030 ± 0.002 , respectivamente; mientras que la mutante PB13-ev1 expresando el gene *pheA^{ev1}* fue una excepción, ya que acumuló un nivel alto de SHIK, 0.073 ± 0.007 g/l comparable con PB12-fbr y PB13-fbr. Este comportamiento resultó inesperado, no habiendo una explicación aparente. En contraste con la mutante PB13-ev1, la cepa PB12-ev1 alcanzó los niveles más bajos de SHIK de 0.006 ± 0.0004 g/l.

Siguiendo un razonamiento similar, la acumulación de SHIK podría explicarse por limitación de las isoenzimas SHIK cinasas (*aroL*, *aroK*) que catalizan la conversión del SHIK a SHIK3P. Estas condiciones metabólicas limitantes puede darse cuando el flujo de carbono que es comprometido a la vía del SHIK excede la capacidad de catálisis de estas isoenzimas. Adicionalmente, también se ha reportado que el SHIK retroinhibe a la enzima SHIK deshidrogenasa (*aroE*) (Dell and Frost, 1993), por lo cual el SHIK acumulado en los cultivos podría a su vez ejercer un efecto de inhibición alostérica sobre la enzima SHIK deshidrogenasa. Esta es otra hipótesis que explicaría la acumulación del DHS en los sobrenadantes. Una tercera posibilidad sería la de una situación de limitación enzimática

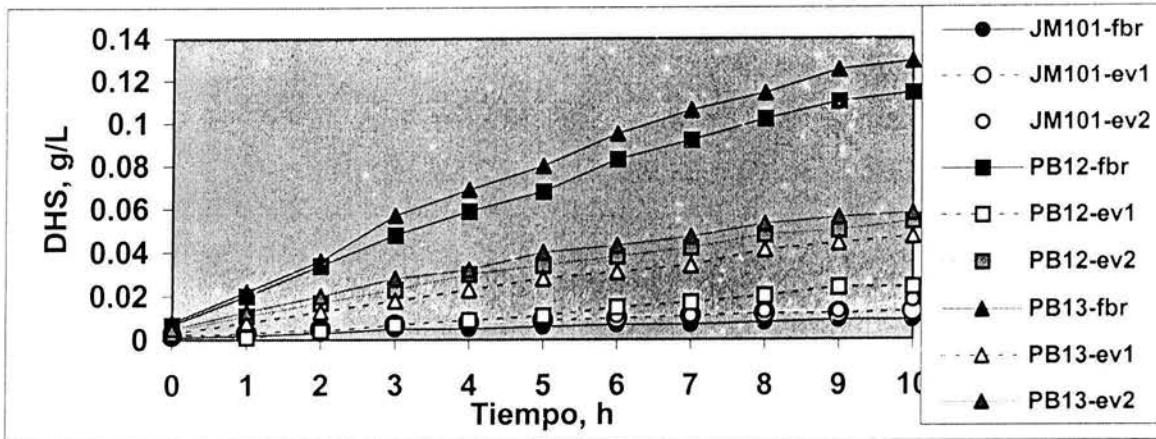


Figura 10. Cinética de producción de DHS en cepas PTS⁺ y mutantes PTS⁻Glc⁺, expresando diferentes versiones de la enzima CM-PDT.

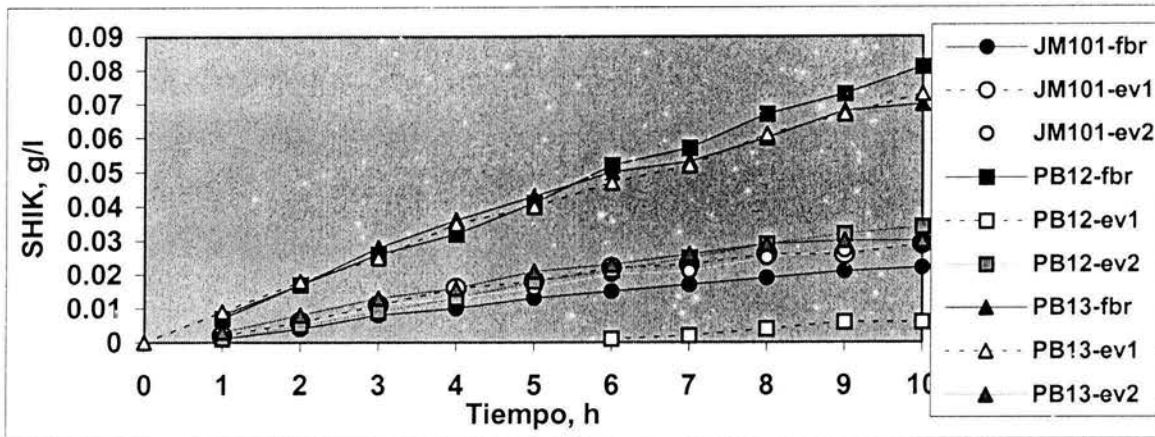


Figura 11. Cinética de producción de SHIK en cepas PTS⁺ y mutantes PTS⁻Glc⁺, expresando diferentes versiones de la enzima CM-PDT.

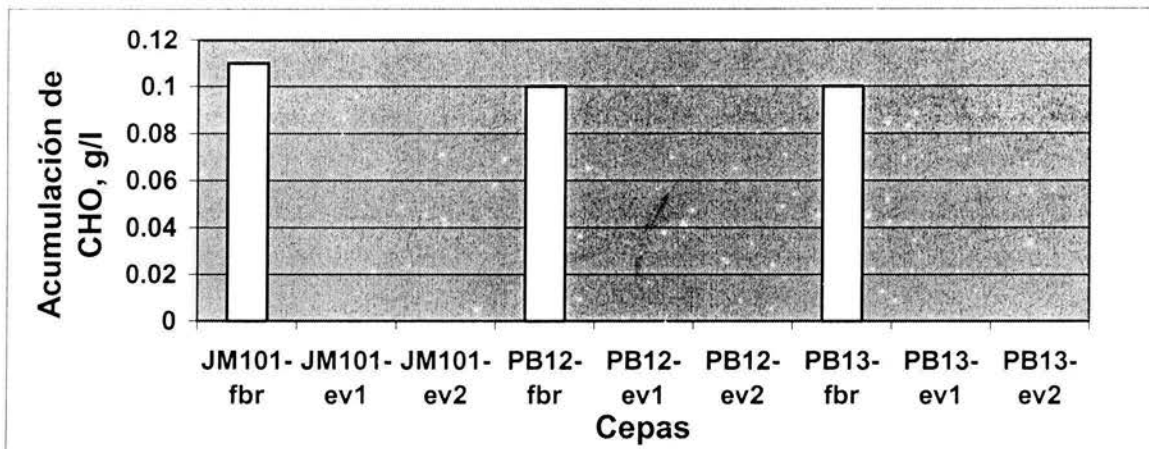


Figura 12. Acumulación de CHO en cepas PTS⁺ y mutantes PTS⁻Glc⁺ al final del cultivo (hora 10).

de la SHIK deshidrogenasa en combinación con un efecto de retroinhibición de esta enzima por SHIK.

En la Figura 12 se observa que el corismato (CHO) fue acumulado solamente en las cepas que expresan el gene *pheA^{fbr}*, JM101-fbr, PB12-fbr y PB13-fbr, alcanzando niveles en el intervalo de 0.1 ± 0.009 a 0.11 ± 0.01 g/l. Sin embargo, CHO no fue detectado en los sobrenadantes de las cepas que sobreexpresan las versiones evolucionadas CM-PDT^{ev1} y CM-PDT^{ev2} (*pheA^{ev1}* y *pheA^{ev2}*). Estos resultados indican que la actividad de la enzima truncada CM-PDT^{fbr} (*pheA^{fbr}*) es factor relevante que limita la velocidad de síntesis de L-Phe. Adicionalmente, estos resultados sugieren que ocurrió un mejoramiento significativo en la conversión de CHO a pefenato, como una consecuencia de la evolución dirigida de la proteína PheA^{fbr}. Esto presupone un mejoramiento de las propiedades catalíticas de las enzimas CM-PDT^{ev1} y CM-PDT^{ev2}.

El intermediario aromático DAHP no fue detectado en los sobrenadantes, lo cual indica que el flujo de carbono metabolizado a través de la enzima DHQ sintasa (*aroB*) no está excediendo la capacidad de catálisis de esta enzima, y por lo tanto, la enzima DHQ sintasa no es un factor limitante de velocidad en la vía del SHIK en estas cepas evaluadas, en contraste con lo que ha sido reportado en otros fondos genéticos (Dell and Frost, 1993).

6.3 Productividades de L-Fenilalanina

La Figura 13 describe el perfil de producción de L-Phe, observándose que la concentración de L-Phe detectada en el sobrenadante se incrementó constantemente a lo largo de cultivo en todas las cepas. En la Figura 13, primeramente, se observa que los niveles más bajos de L-Phe fueron alcanzados por las cepas que expresan el gene

pheA^{br} (JM101-fbr, PB12-fbr y PB13-fbr), acumulando concentraciones de 0.1 ± 0.009 , 0.16 ± 0.01 y 0.1 ± 0.008 g/l, respectivamente; mientras que, cuando fueron expresadas las versiones evolucionadas (*pheA^{ev1}* y *pheA^{ev2}*) se alcanzaron niveles de L-Phe dos o tres veces más altas. Los datos de acumulación de L-Phe pueden ajustarse a ecuaciones lineales con buenos coeficientes de correlación ($R^2=0.999$).

Uno de los parámetros más relevantes para evaluar la rapidez con la que un biocatalizador celular o cepa de producción convierte el sustrato a producto, es el parámetro conocido como velocidad específica de producción, también designado productividad específica (q_{phe}) y es reportada en mg/g-peso-seco · h. La q_{phe} permanece relativamente constante en cada cepa a lo largo del cultivo (datos no mostrados). Este hecho es una consecuencia de que la biomasa permaneció relativamente constante, así como también, la acumulación de L-Phe se incrementó de manera constante. Estos resultados también indican que los niveles de actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de L-Phe permanecieron sin variaciones relevantes a lo largo del experimento de 10 horas de duración. En la Figura 14 se muestra la q_{phe} promedio, la cual fue calculada para tomar el valor más representativo durante todo el cultivo, observándose que, las cepas que expresan el gene *pheA^{br}* (JM101-fbr, PB12-fbr y PB13-fbr) tuvieron las q_{phe} más bajas alcanzando valores de 8.66 ± 0.60 , 14.09 ± 0.96 , 9.43 ± 0.70 mg/g peso-seco · h. En contraste, al sobreexpresar las versiones evolucionadas *pheA^{ev1}* y *pheA^{ev2}* en las cepas JM101 y PB12, la q_{phe} se incrementó entre 3 y 4 veces, alcanzándose productividades específicas similares de 36.34 ± 2.50 a 40.60 ± 3.17 mg/g peso-seco · h. Al comparar estas productividades específicas con las más altas reportadas en la literatura por Förberg y col. (1988) que son del orden de 20-30 mg/g peso-seco · h, se observa que son significativamente mayores.

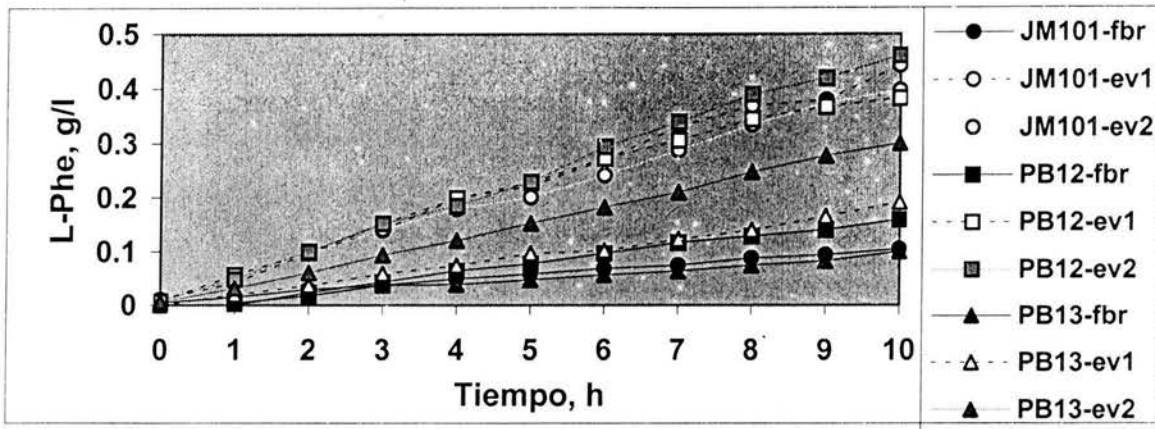


Figura 13. Cinética de producción de L-Phe en cepas PTS⁺ y mutantes PTS⁻Glc⁺, expresando diferentes versiones de la enzima CM-PDT.

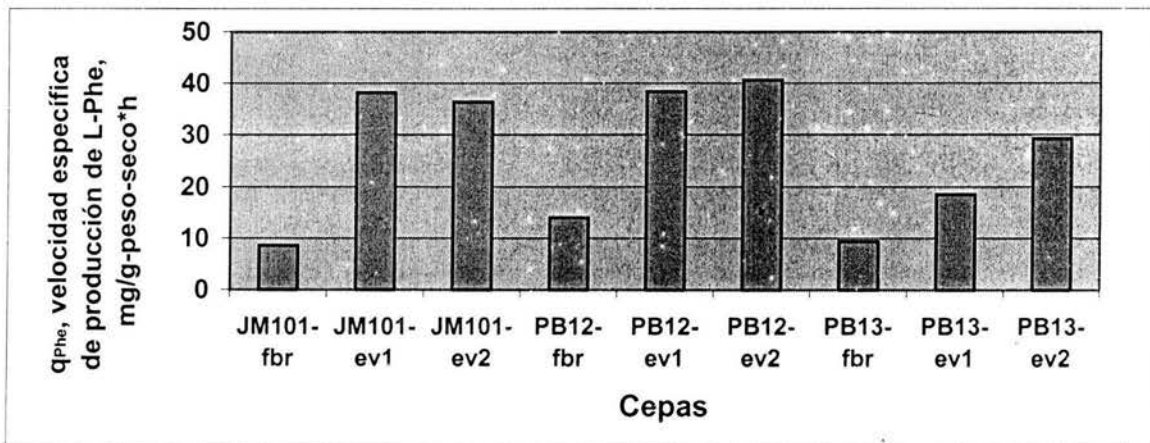


Figura 14. Velocidad específica promedio producción de L-Phe (q_{phe} promedio) durante las 10 horas que duraron los cultivos.

La q_{phe} aumentó significativamente con la expresión de las versiones $pheA^{ev1}$ y $pheA^{ev2}$ en las mutantes PB13-ev1 y PB13-ev2, alcanzando valores de 18.54 ± 0.97 y 29.25 ± 0.97 mg/g peso-seco \cdot h, respectivamente. Por consiguiente, se puede concluir que la expresión de $pheA^{ev1}$ y $pheA^{ev2}$ tuvo un impacto positivo relevante sobre la q_{phe} , incrementándola entre 2 y 4 veces. Sin embargo, estos niveles alcanzados por PB13-ev1 y PB13-ev2 fueron

significativamente menores al compararlos con los de las cepas JM101 y PB12. Por otro lado, al comparar la cepa JM101 con la PB12, aparentemente no se observó ningún efecto positivo sobre la q_{Phe} causado por la inactivación del PTS. Inclusive, en la mutante PB13, se observó que la q_{Phe} fue significativamente menor que en JM101. La explicación de este hecho inesperado es que en el fondo genético PTS^-Glc^+ , el flujo de carbono en forma de intermediarios aromáticos excretados (DHS, SHIK y CHO) es mayor comparado con el fondo genético PTS^+ . Esta situación metabólica disminuye considerablemente la productividad específica de L-Phe. En consecuencia, el impacto positivo de la inactivación del PTS no puede ser apreciada si solamente se considera la q_{Phe} .

La Figura 15 presenta un esquema de los principales compuestos acumulados en los sobrenadantes de los cultivos en reposo al final del experimento (hora 10), permitiendo visualizar la recuperación de carbono en la forma de intermediarios aromáticos (DHS, SHIK y CHO), ácido acético y producto final (L-Phe). El ácido acético fue el único ácido orgánico detectado en los sobrenadantes, en contraste, fórmico, propiónico, butírico y láctico no fueron detectados. Etanol tampoco fue detectado en los sobrenadantes. En la figura 15 puede observarse que, en el fondo PTS^+ el ácido acético comenzó detectarse desde el inicio de los cultivos, llegando a ser el principal compuesto producido con concentraciones en el intervalo de 1.1-1.3 g/l; mientras que en el fondo PTS^-Glc^+ solo fue detectado a partir de la hora 5, alcanzándose concentraciones entre 0.2-0.3 g/l, las cuales son significativamente menores que en el fondo PTS^+ , sin importar cuál versión del gene *pheA* fue sobreexpresada. Las velocidades específicas de producción de ácido acético (q_{Acet}) en el fondo PTS^+ alcanzaron valores promedio de $0.06-0.08 \pm 0.004$ g/g-peso-seco.

h, mientras que en las mutantes $\text{PTS}^- \text{Glc}^+$, fueron significativamente menores de $0.03\text{-}0.04 \pm 0.003 \text{ g/g-peso-seco} \cdot \text{h}$.

Este comportamiento fisiológico ya ha sido reportado en trabajos previos en nuestro laboratorio, en donde se observó que las mutantes $\text{PTS}^- \text{Glc}^+$ producen un 80 % menos de ácido acético que la cepa parental PTS^+ (Sigüenza *et al.*, 1999). La explicación de este comportamiento en una mutante desprovista del PTS es que, teóricamente, produce cantidades relativamente menores de piruvato, lo cual puede traducirse en una menor producción de ácido acético. Esta característica de las mutantes $\text{PTS}^- \text{Glc}^+$ constituye una ventaja haciéndolas candidatas atractivas para procesos de producción más eficientes, ya que al desperdiciar menos carbono en forma de subproductos, ese carbono “ahorrado” puede ser canalizado hacia la vía de síntesis del metabolito de interés. Además, es ampliamente conocido que la producción de ácido acético disminuye el pH intracelular y del medio de cultivo, lo cual afecta negativamente, desacoplando los procesos energéticos celulares, y además tiene efectos tóxicos sobre el crecimiento, viabilidad celular, rendimiento y productividad de los cultivos (Koh *et al.*, 1992; Lischke *et al.*, 1993). Por esta razón, la inactivación del PTS también resultó ser una estrategia genética exitosa al disminuir significativamente la generación de ácido acético en los cultivos de producción de L-Phe.

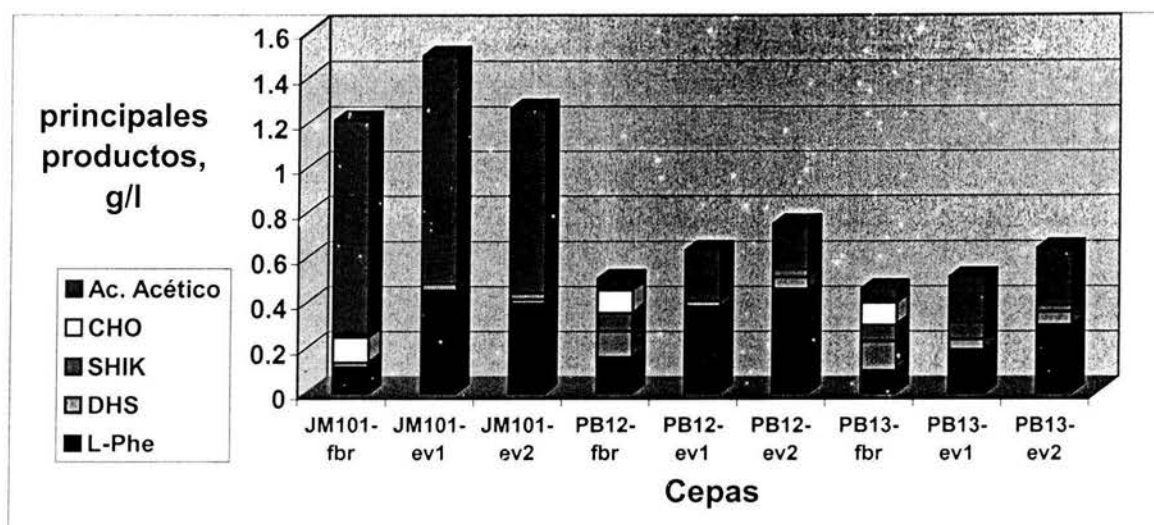


Figura 15. Principales subproductos (DHS, SHIK y CHO) y productos (L-Phe) detectados en los sobrenadantes de los cultivos en reposo.

6.4 Rendimientos

Dado que q_{Glc} y q_{Phe} se mantuvieron constantes durante el transcurso del tiempo de cultivo, los rendimientos de L-Phe sintetizada a partir de glucosa ($Y_{Phe/Glc}$) fueron calculados a partir de estas velocidades específicas de acuerdo con la ecuación $Y_{Phe/Glc} = q_{Phe} / q_{Glc}$ y son mostrados en la Figura 14. En general, se observan dos efectos claros sobre el $Y_{Phe/Glc}$, primeramente al comparar los fondos genéticos PTS^+ con PTS^-Glc^+ , y en segundo lugar, el efecto debido a la expresión de las versiones evolucionadas $pheA^{ev1}$ y $pheA^{ev2}$. Así por ejemplo, las cepas JM101-fbr, PB12-fbr y PB13-fbr, expresando la versión truncada $pheA^{fbr}$, alcanzaron los $Y_{Phe/Glc}$ más bajos de 0.05 ± 0.002 , 0.14 ± 0.017 g/g y 0.10 ± 0.01 respectivamente. En estas cepas se observa que, la inactivación del PTS incrementó el rendimiento en 200 y 280 %, respectivamente. Por otro lado, las cepas JM101-ev1 y JM101-ev2 tuvieron $Y_{Phe/Glc}$ de 0.21 ± 0.01 y 0.22 ± 0.02 g/g, respectivamente. Si estos

rendimientos son comparados con los de la cepa JM101-fbr para cuantificar el efecto del uso de los genes evolucionados, se observa un incremento en el $Y_{Phe/Glc}$ de 400 %. Ahora bien, en el fondo genético PTS^-Glc^+ , ambas mutantes PB12-ev1 y PB12-ev2 tuvieron los más altos $Y_{Phe/Glc}$ de 0.33 ± 0.02 g/g (Figura 16). Comparando estos rendimientos con los de sus contrapartes JM101-ev1 y JM101-ev2, se aprecia un incremento en el rendimiento de 50-57 % debido a la inactivación del PTS, y un incremento de 235% comparado con el rendimiento de la PB12-fbr debido al empleo de las versiones evolucionadas. Para cuantificar el impacto de los dos efectos adicionados, tanto de la inactivación del PTS como el empleo de las versiones evolucionadas, comparamos los $Y_{Phe/Glc}$ de las cepas JM101-fbr con los de PB12-ev1 y PB12-ev2, observando que la mejora en el rendimiento corresponde al 660 %. Estos resultados obtenidos con las cepas hospederas JM101 y PB12 indican que las estrategias de inactivación del PTS y la Ingeniería de Proteínas aplicada al mejoramiento de la actividad CM-PDT (*pheA*) fue una estrategia exitosa para incrementar dramáticamente el rendimiento de L-Phe sintetizada a partir de glucosa.

Por otro lado, ambas mutantes PB13-ev1 y PB13-ev2 alcanzaron $Y_{Phe/Glc}$ de 0.20 ± 0.02 g/g. Al comparar con los rendimientos de la PB13-fbr, el rendimiento se ve incrementado 200 %, debido a las versiones evolucionadas. En contraste, al comparar estos últimos rendimientos con los de JM101-ev1 y JM101-ev2, se observa que son muy similares, y por lo tanto, en la cepa hospedera PB13 no se observó ningún efecto positivo en el $Y_{Phe/Glc}$ debido a la inactivación del PTS.

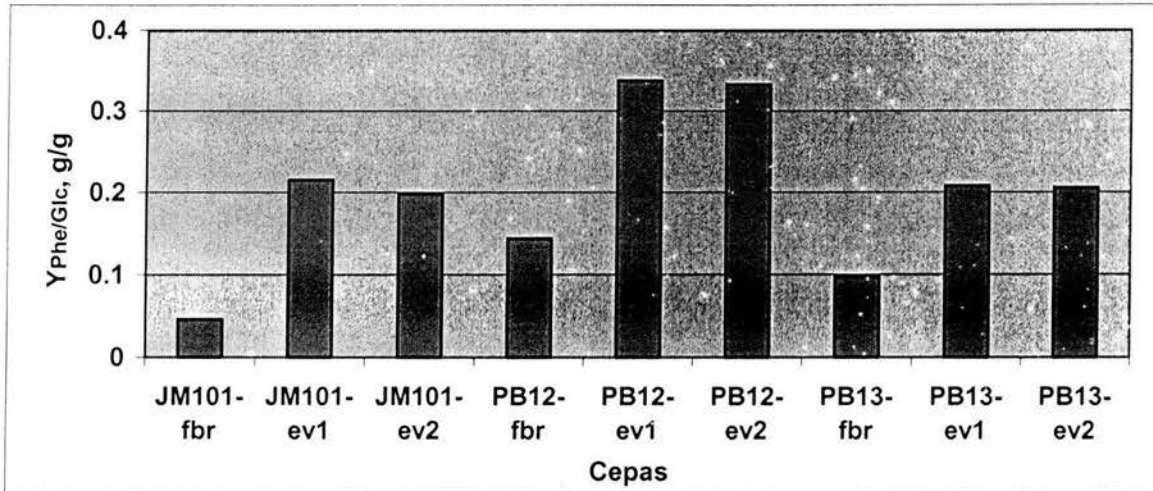


Figura 16. Rendimientos absolutos de L-Phe sintetizada a partir de Glc ($Y_{Phe/Glc}$), reportados en g/g.

De acuerdo con los coeficientes de rendimientos máximos teóricos ($^{max}Y_{Phe/Glc}$) las cepas JM101-ev1 y JM101-ev2 alcanzaron $Y_{Phe/Glc}$ que corresponden al 74 y 77 % del $^{max}Y_{Phe/Glc}$ calculado para una cepa con PTS activo y sin expresión del gene *pps*, o del 36 al 38 % del $^{max}Y_{Phe/Glc}$ calculado para una cepa con PTS inactivo o que expresa *pps*. Mientras que en el fondo genético PTS^-Glc^+ , ambas cepas PB12-ev1 y PB12-ev2 alcanzaron rendimientos que corresponden al 60 % del $^{max}Y_{Phe/Glc}$ calculado para una cepa con PTS inactivo. En contraste, las cepas PB13-ev1 y PB13-ev2 alcanzaron $Y_{Phe/Glc}$ que corresponden al 36% del mismo coeficiente máximo teórico. Por lo tanto, la inactivación del PTS sólo tuvo un impacto relevante positivo sobre el $Y_{Phe/Glc}$ en las mutantes derivadas de PB12 y no así en las derivadas de PB13. La explicación de este hecho inesperado será más evidente con el cálculo del rendimiento global de aromáticos ($Y_{Arom/Glc}$).

La acumulación de intermediarios aromáticos se observó en todas las cepas. Sin embargo, los mayores niveles fueron detectados en el fondo genético PTS^-Glc^+ . El $Y_{Arom/Glc}$

se calculó para evaluar el potencial que tienen las cepas de mejorar la producción de L-Phe y apreciar el impacto negativo causado por la acumulación de intermediarios sobre el $Y_{Phe/Glc}$. Para el cálculo de este parámetro se tomaron en consideración los intermediarios aromáticos DHS, SHIK, CHO y el producto final L-Phe. La figura 17 muestra los $Y_{Arom/Glc}$ calculados para todas las cepas. En el fondo genético PTS⁺ los $Y_{Arom/Glc}$ alcanzados fueron de 0.15 ± 0.01 , 0.23 ± 0.02 y 0.22 ± 0.02 g/g para las cepas JM101-fbr, JM101-ev1 y JM101-ev2, respectivamente; mientras que, las mutantes PTS⁻Glc⁺ PB12-fbr, PB12-ev1 y PB12-ev2 alcanzaron $Y_{Arom/Glc}$ más elevados de 0.30 ± 0.02 , 0.37 ± 0.03 y 0.40 ± 0.03 g/g, respectivamente. Situación similar ocurrió con las mutantes PB13-fbr, PB13-ev1 y PB13-ev2 alcanzando $Y_{Arom/Glc}$ de 0.29 ± 0.02 , 0.47 ± 0.03 y 0.26 ± 0.01 g/g. Al comparar las magnitudes de los $Y_{Arom/Glc}$ con los $Y_{Phe/Glc}$, es evidente que, el fondo genético PTS⁻Glc⁺ confiere un potencial significativamente mayor que el PTS⁺ para producción de compuestos aromáticos. Inclusive, el fondo genético de la mutante PB13 alcanza niveles significativamente mayores que el de la cepa JM101. Esto permite apreciar el efecto positivo de la inactivación del PTS sobre el $Y_{Arom/Glc}$ global tanto en el fondo genético de la mutante PB12 así como también en el de la PB13. Estos resultados también indican que, el $Y_{Phe/Glc}$ podría ser mejorado aún más implementando las estrategias genéticas adecuadas para superar los pasos enzimáticos limitantes que causan la acumulación de intermediarios aromáticos. Estas estrategias implican la sobreexpresión simultánea de los genes *aroE* y ya sea *aroK* o *aroL*.

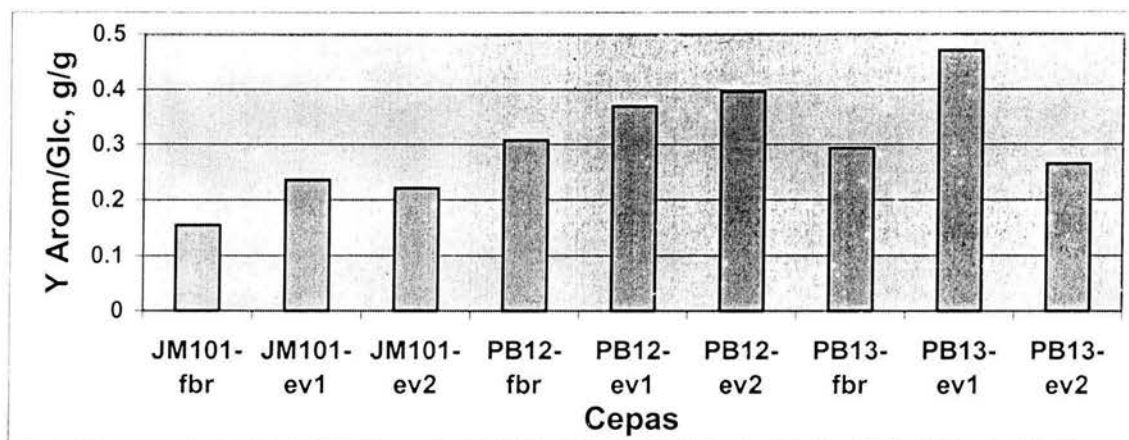


Figura 17. Rendimientos globales de compuestos aromáticos incluyendo los intermediarios aromáticos (DHS, SHIK y CHO) y L-Phe ($Y_{Arom/Glc}$), reportados en g/g.

6.5 Redistribución de flujos metabólicos en el nodo PEP

Las velocidades de producción de L-Phe, de intermediarios aromáticos y de producción de ácido acético permitieron determinar parcialmente la redistribución de flujos metabólicos en el nodo PEP entre los fondos genéticos PTS^+ , PTS^-Glc^+ y sus derivadas modificadas genéticamente. De acuerdo con los datos de Flores y col., (2002) el flujo relativo de carbono dirigido hacia la biosíntesis de compuestos aromáticos fue de 1.5 y 2.0 % de la q_{Glc} en las cepas JM101 y PB12, respectivamente (Flores *et al.*, 2002); mientras que en las cepas derivadas de JM101 que fueron modificadas genéticamente en este estudio, este flujo relativo se incrementó de 8 a 11 veces, alcanzando valores en el intervalo de 15.4-22 %, como se muestra en la Figura 18. Cabe mencionar que, los flujos metabólicos reportados por Flores y col., (2002) fueron obtenidos en condiciones diferentes a las utilizadas en el presente estudio, por ejemplo, se utilizaron células creciendo exponencialmente en medio mínimo, mientras que en este estudio se utilizaron las mismas cepas pero transformadas con tres plásmidos creciendo en fase exponencial en medio rico

(ver materiales y métodos). Sin embargo, puede asumirse que en cepas cultivadas en condiciones de crecimiento en medio rico de aminoácidos, el flujo de carbono

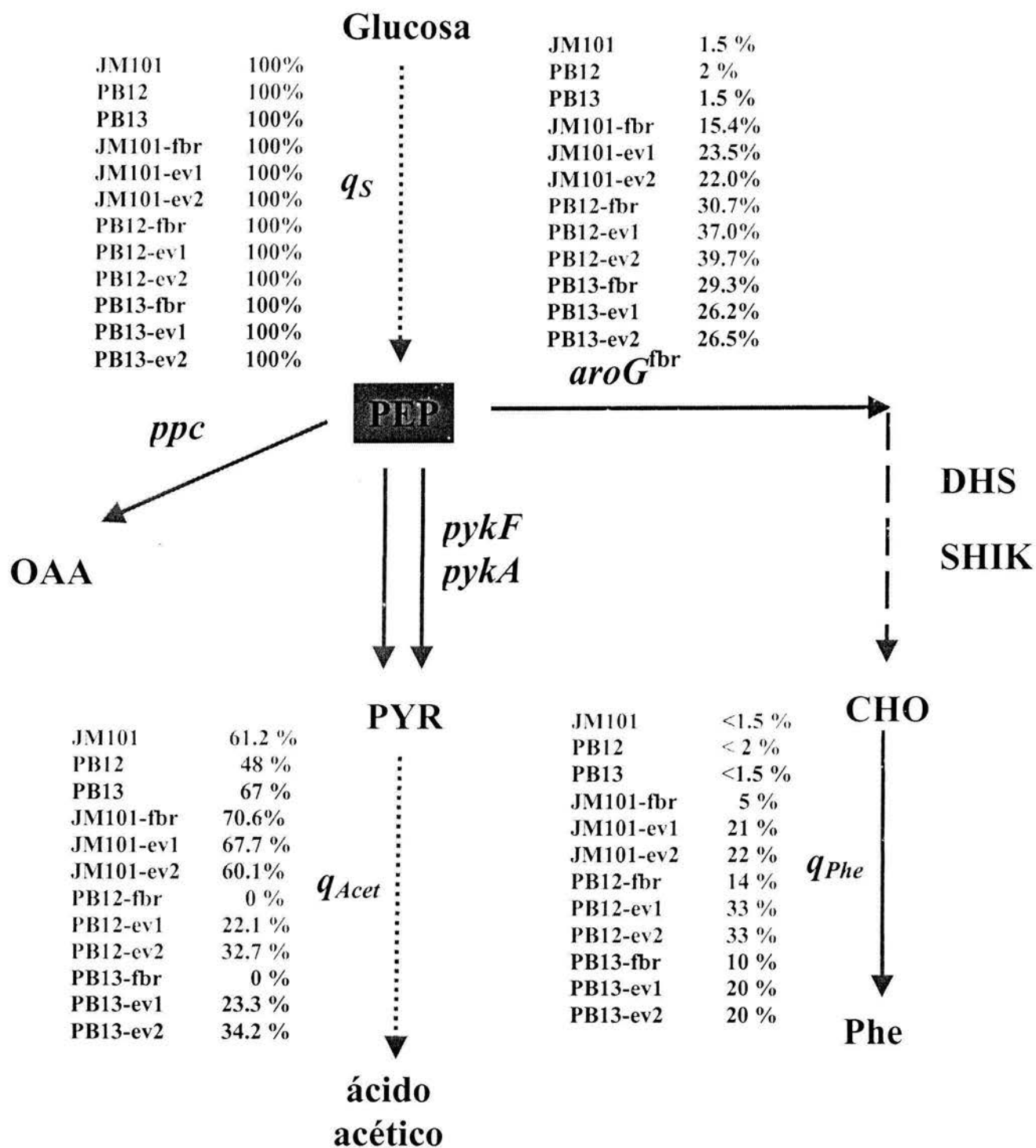


Figura 18. Distribución parcial de carbono alrededor del nodo PEP en las cepas JM101 y PB12, comparadas con las cepas sobreproductoras de L-Phe.

comprometido hacia la vía del SHIK debe ser menor, ya que es conocido que el flujo de carbono dirigido a la vía común de aminoácidos aromáticos está estrictamente controlado por inhibición alósterica por los aminoácidos aromáticos (Pitard, 1996). Por otro lado, en las mutantes PB12, el flujo de carbono relativo aumentó de 15 a 20 veces, alcanzando valores de 30.7-39.7 %; mientras que en la mutante PB13, el flujo relativo también se incrementó de 17.5 a 19.5 veces, obteniéndose valores de 26.2-29.3 %. Estos análisis de flujos relativos indicaron que la redistribución de flujos de carbono alrededor del nodo PEP fue alterada dramáticamente, como consecuencia de las estrategias genéticas realizadas. También, cabe resaltar en la Figura 18, el cambio dramático en el flujo relativo de carbono dirigido hacia la producción de ácido acético en las mutantes PTS, como una consecuencia directa de la inactivación del PTS. Además, también es notable que todas las mutantes PTS⁻ Glc⁺ tienen el potencial de mejorar aún más la capacidad de biosíntesis de L-Phe. Este potencial puede ser apreciado al comparar los flujos de carbono que son dirigidos hacia la vía del SHIK con los flujos relativos canalizados hasta el producto final (L-Phe).

En los sobrenadantes de los cultivos en reposo se detectó la acumulación significativa de algunos intermediarios aromáticos tales como DHS, SHIK y CHO. La excreción y acumulación de estos intermediarios es interpretada como evidencia de que el flujo de carbono, canalizado hacia la vía de SHIK, está excediendo la capacidad metabólica de algunas enzimas de esta vía, llegando a ser limitantes. Esta situación limitante se generó a causa del redireccionamiento de flujos de carbono del metabolismo central hacia la vía del SHIK debido a la sobreexpresión *aroG^{br}* y *tklA* en combinación con la inactivación del PTS. Adicionalmente, a esta situación limitante, otros efectos de retro-inhibición causados por los intermediarios pueden ocurrir, principalmente, sobre las enzimas que los sintetizan. Así, de acuerdo con esta interpretación, la acumulación de SHIK puede ser atribuida a

limitación enzimática de las isoenzimas SHIK cinasas (*aroL*, *aroK*). Sin embargo, es posible que estos efectos limitantes estén combinados, a su vez, con efectos de retroinhibición ejercida por el SHIK acumulado sobre la enzima SHIK deshidrogenasa (*aroE*), como previamente ha sido reportado en trabajos de Dell y Frost (1993). En consecuencia, la inhibición de la SHIK deshidrogenasa podría a su vez causar la acumulación del DHS. En general, también se observó que la acumulación de DHS y SHIK fue significativamente mayor en el fondo genético PTS^-Glc^+ que en sus contrapartes PTS^+ . Este hecho indica que el flujo de carbono dirigido hacia la vía del SHIK es mayor en el fondo PTS^-Glc^+ y se refleja causando una mayor limitación enzimática. Por tanto, el potencial de las mutantes PTS^-Glc^+ de canalizar mayor flujo de carbono es debido principalmente a la mayor disponibilidad de PEP.

Por otro lado, la acumulación de CHO en las cepas que sobreexpresan la enzima CM-PDT^{fbr} (*pheA^{fbr}*) indica que esta enzima truncada es limitante de la velocidad de síntesis de L-Phe. En contraste, la sobreexpresión de las enzimas evolucionadas CM-PDT^{ev1} y CM-PDT^{ev2} (*pheA^{ev1}* y *pheA^{ev2}*) no causó acumulación de CHO. Estos resultados sugieren fuertemente un mejoramiento significativo en la conversión de CHO a pefenato en las versiones evolucionadas, y por consiguiente, de sus propiedades catalíticas.

En varios trabajos, la importancia de la inactivación del PTS ha sido evaluada (Gosset *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Báez *et al.*, 2001; Yi *et al.*, 2003; Chandran *et al.*, 2003). Chen y col. (1997) reportaron la construcción de una mutante PTS-(PP316) transformada con plásmidos que coexpresan *aroF^{fbr}* y *pheA^{fbr}* para sobreproducción de L-Phe. Contrario a la hipótesis formulada la mutante PP316 produjo niveles menores del L-Phe comparada con la cepa progenitora. La mutante PP316 es similar a PB12 y PB13, ya todas poseen la misma escisión del PTS, transportan glucosa empleando GalP y Glk para

fosforilarla. Sin embargo, estas mutantes fueron obtenidas mediante diferentes métodos de selección. En el caso de PP316, el gene que codifica el represor GalR fue inactivado y la cepa fue aislada por selección en cajas de medio mínimo; mientras que las mutantes PB12 y PB13 fueron aisladas como revertantes espontáneas glucosa⁺ por su rápido crecimiento en un sistema de cultivo continuo. La diferencia en rendimientos y productividades entre las las mutantes PP316 *versus* PB12 y PB13 sugiere que las estrategias de selección son importantes para obtener cepas de producción eficientes.

7. CONCLUSIONES

La cepa JM101-ev2 y su derivada PB12-ev2 alcanzaron $Y_{Phe/Glc}$ de 0.21 g/g y 0.33 g/g, respectivamente. Estos rendimientos equivalen al 38 y al 60 % del rendimiento máximo teórico $^{m\acute{a}x}Y_{Phe/Glc}$ (0.55).

La inactivación del PTS en la mutante PB12 tuvo un impacto positivo relevante sobre el $Y_{Phe/Glc}$, mejorándolo 57 % comparado con su contraparte PTS⁺. En contraste, el efecto positivo de la inactivación del PTS no pudo ser apreciado en la mutante PB13, debido a una mayor acumulación de intermediarios.

La evolución dirigida del gene truncado $pheA^{fbr}$ resultó ser una estrategia exitosa al incrementar significativamente el $Y_{Phe/Glc}$ en un 350 % en la cepa JM101-ev2, mientras que, en las mutantes PB12-ev1 y PB12-ev2 se logró un incremento de 130 %.

La acumulación de DHS y SHIK sugiere fuertemente que las isoenzimas SHIK cinasas (*aroL*, *aroK*) y la enzima SHIK deshidrogenasa (*aroE*) son limitantes de velocidad en la síntesis de L-Phe, y por tanto, son puntos de control del flujo de carbono en la vía del SHIK.

La acumulación de CHO en las cepas que sobreexpresan la enzima CM-PDT^{fbr} ($pheA^{fbr}$) indicó que esta enzima es limitante de la velocidad; mientras que las versiones evolucionadas evolucionadas CM-PDT^{ev1} y CM-PDT^{ev2} ($pheA^{ev1}$ y $pheA^{ev2}$) no causaron

acumulación de CHO, lo cual presupone un mejoramiento substancial en los parámetros catalíticos de estas enzimas.

Las productividades específicas alcanzadas por las cepas JM101-ev1, JM101-ev2, PB12-ev1 y PB12-ev2 ($q_{Phe} = 40$ mg/g-peso-seco*h) y los $Y_{Phe/Glc}$ son de los más altos reportados en la literatura.

Las cepas sobreproductoras de L-Phe derivadas de la mutantes PB12 y PB13 produjeron significativamente menos ácido acético que las derivadas de JM101. Este hecho es una consecuencia de la mayor eficiencia de utilización de carbono en las mutantes PB12 y PB13, y sugiere además, que el $Y_{Phe/Glc}$ puede ser mejorado aún más.

9. PERSPECTIVAS

La acumulación de intermediarios aromáticos detectada en las mutantes $\text{PTS}^- \text{Glc}^+$ fue significativamente mayor que el fondo genético PTS^+ , lo cual indica que las mutantes $\text{PTS}^- \text{Glc}^+$ tienen mayor potencial para mejorar aún más el $Y_{\text{Arom}/\text{Glc}}$ mediante la implementación de estrategias adecuadas de expresión de genes que codifican enzimas identificadas como pasos limitantes. De acuerdo con los resultados del presente estudio, el incremento de las actividades enzimáticas limitantes que incluyen las isoenzimas SHIK cinasas (*aroL*, *aroK*) y SHIK deshidrogenasa (*aroE*) tendría un impacto positivo mejorando el rendimiento y la productividad de L-Phe en el fondo JM101 y aún más en PB12 y PB13.

Por otro lado, la producción de ácido acético puede interpretarse como desperdicio de carbono, lo cual impacta negativamente el rendimiento y la productividad. Por lo tanto, la generación de ácido acético es un indicador de que el rendimiento y la productividad pueden ser mejoradas aún más en las mutantes $\text{PTS}^- \text{Glc}^+$. Para lograr este objetivo es necesario disminuir o eliminar el flujo de carbono dirigido hacia la formación de acetato. Esto puede ser logrado mediante la inactivación de una o ambas piruvato cinasas (*pykA* y *pykF*). El estudio del efecto de las inactivaciones combinadas de PTS y piruvato cinasas sobre el rendimiento no ha sido estudiado aún. Asimismo, la respuesta del metabolismo central para contrarrestar esta combinación de mutaciones tampoco ha sido evaluada. Por lo que resulta interesante estudiar la respuesta del metabolismo central al disminuir o eliminar el flujo de carbono hacia la formación de piruvato, en genotipos $\text{PTS}^- \text{Glc}^+ \text{pykA}^-$, $\text{PTS}^- \text{Glc}^+ \text{pykF}^-$ o $\text{PTS}^- \text{Glc}^+ \text{pykA}^- \text{pykF}^-$. En este contexto, la pregunta que surge es ¿cuál es el flujo mínimo de carbono metabolizado a piruvato que es necesario para que la célula pueda cubrir su demanda energética y continuar produciendo L-Phe con un alto rendimiento?. El

$Y_{Phe/Glc}$ alcanzado en el fondo genético de la mutante PB12-ev2 fue 60 % del $^{max}Y_{Phe/Glc}$, este resultado también sugiere que el $Y_{Phe/Glc}$ puede ser optimizado aún más. Estudios en triples mutantes $PTS^-Glc^+ pykA^- pykF^-$ en donde se module la expresión de la enzima piruvato cinasa pueden dar respuesta a este tipo de preguntas.

La evaluación de cepas sobreproductoras de L-Phe mediante el sistema de células en reposo permitió evaluar la máxima capacidad de biosíntesis de L-Phe, e identificar de una manera relativamente rápida a las cepas con las mejores capacidades biosintéticas de L-Phe. Una vez identificadas estas cepas, el siguiente nivel de caracterización es a nivel de biorreactor, en donde se verificará si los altos rendimientos logrados en los cultivos en reposo pueden ser reproducidos en biorreactores. La hipótesis formulada es que las condiciones de altos rendimientos y productividades logradas en los cultivos en reposo pueden ser similares a las que se obtendrían en la fase estacionaria de crecimiento en cultivos llevados a cabo en biorreactor.

Es necesaria la realización de estudios básicos de expresión genética que permitan identificar y explicar a nivel molecular, entre las cepas sobreproductoras de L-Phe, algunos de los comportamientos fisiológicos inesperados, tales como los cambios significativos observados en flujos relativos en el metabolismo central y en la vía del SHIK. La redistribución tan drástica del flujo de carbono en el metabolismo central y la acumulación de intermediarios aromáticos de la vía de SHIK podrían tener a su vez ciertos efectos sobre la regulación genética y su vez causar las diferencias fisiológicas observadas. También, diferencias en expresión genética, entre cepas con el mismo fenotipo como son PB12 y PB13, podrían explicar las diferencias fisiológicas importantes relacionadas al transporte de glucosa, redireccionamiento del flujo de carbono hacia la vía del SHIK y producción de L-

Phe. La aplicación de técnicas muy sensibles como la de la transcriptasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) puede permitir caracterizar los patrones de expresión mRNA de genes del metabolismo central, vía común de aromáticos, transporte de glucosa y compuestos aromáticos. El análisis por comparación de estos patrones de expresión permite inferir algún cambio regulatorio, mismo que puede ser estudiado en mayor detalle. Estos estudios podrían sugerir también ciertos de mecanismos de regulación que no han sido determinados aún.

10. REFERENCIAS

- Ager DJ, Pantaleone DP, Henderson SA, Katritzky AR & Prakash I. Walters D.E. 1998. Commercial, Synthetic Nonnutritive Sweeteners. *Angew Chem Int Ed* 37, 1802-1817.
- Arkin AP, Youvan DC, 1992. An algorithm for protein engineering: simulations of recursive ensemble mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(16):7811-5.
- Báez JL, Bolívar F, Gosset G. 2001. Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase system. *Biotechnol Bioeng* 73: 530-535.
- Báez-Viveros JL, Osuna J, Hernández-Chávez G, Soberón X, Bolívar F, Gosset G. 2004. Metabolic Engineering and Protein Directed Evolution Increase the Yield of L-Phenylalanine Synthesized from Glucose in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 87(4): 516-524.
- Bailey JE. 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science* 252 : 1668-1675.
- Berry A, Dodge TC, Pepsin M, Weyler W. 2002. Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 28:127-33.
- Berry A. 1996. Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Trends Biotechnol* 14, 250-256.
- Bongaerts J, Krämer M, Müller U, Raeven L, Wubbolts M. 2001. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metab Eng* 3: 289-300.
- Butchko HH & Stargel WW. 2001. Aspartame: Scientific evaluation in the postmarketing period. *Reg Toxicol Pharmacol* 34: 221-233.
- Cahoon EB, Shanklin J. 2000. Substrate-dependent mutant complementation to select fatty acid desaturase variants for metabolic engineering of plant seed oils. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(22):12350-5.
- Cahoon EB, Shanklin J. 2000. Substrate-dependent mutant complementation to select fatty acid desaturase variants for metabolic engineering of plant seed oils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(22):12350-5.

- Chandran SS, Yi J, Draths KM, Daeniken R, Weber W, Frost JW. 2003. Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnol Prog* 19: 808-814.
- Chen R, Hatzimanikatis V, Yap WMGJ, Postma PW, Bailey JE. 1997. Metabolic consequences of phosphotransferase (PTS) mutation in a phenylalanine-producing recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 13: 768-775.
- Clark G.S. 1990; Phenylethyl alcohol. *Perfum flavor* 15: 37-44.
- Dell K.A., Frost J.W. 1993. Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: rate-limiting enzymes in the common pathway of aromatic amino acid biosynthesis. *J Am Chem Soc* 115: 11581-11589.
- della-Cioppa G, SJ Garger, GG Sverlow, TH Turpen, LK Grill. 1990. Melanine production in *Escherichia coli* from a cloned tyrosinase gene. *Biotechnology* 8 : 634-38.
- Dewick PM. 1998. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat Prod Rep.* 15(1):17-58. Review.
- Draths KM, Frost JW. 1991. Conversion of D-Glucose into catechol: the non-so-common pathway of aromatic biosynthesis. *J Am Chem Soc* 113: 9361-9363.
- Draths KM, Frost JW. 1994 a. Environmentally compatible synthesis of adipic acid from D-glucose. *J Am Chem Soc.* 116, 399-400.
- Draths KM, Ward TL, Frost JW. 1992. Biocatalysis and nineteenth century organic chemistry: conversion of D-glucose into quinoid organics. *J Am Chem Soc.* 114, 9725-9726.
- Emmerling M, Dauner M, Ponti A, Fiaux J, Hochuli M, Szyperski T, Wuthrich K, Bailey JE, Sauer U. 2002. Metabolic flux responses to pyruvate kinase knockout in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* Jan;184(1):152-64.
- Etschmann MMW, Bluemke W, Sell D. 2002. Biotechnological production of 2-phenyletanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 59: 1-8.
- Fabre CE, Blanc PJ, Goma G. 1998. 2-phenylethyl alcohol: an aroma profile. *Perfum flavor* 23: 43-45.
- Farinas ET, Bulter T, Arnold FH. 2001. Directed enzyme evolution. *Curr. Opin Biotechnol,* 12, 545-551.

- Flores N., Yong-Xiao J., Berry A., Bolivar F., Valle F. 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 14: 620-623.
- Flores S, Gosset G, Flores N, de Graff AA, Bolivar F. 2002. Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labeling and NMR spectroscopy. *Metab Eng* 4: 124-137.
- Förberg C, Eliaeson T, Häggström L. 1988. Correlation of theoretical and experimental yields of phenylalanine from non-growing cells of a *rec Escherichia coli* strain. *J Biotechnol* 7: 319-332.
- Foulongne V, Walravens K, Bourg G, Boschioli ML, Godfroid J, Ramuz M, O'Callaghan D. 2001. Aromatic compound-dependent *Brucella suis* is attenuated in both cultured cells and mouse models. *Infect Immun.* 69(1):547-50.
- Frost JW, KM Draths. 1995. Biocatalytic syntheses of aromatics from D-glucosa. Renewable microbial sources of aromatic compounds. *Annu Rev Microbiol.* 49 : 557-79.
- Gething MJ, Davidson BE. 1976 Chorismate mutase/prephenate dehydratase from *Escherichia coli* K12. 2. Evidence for identical subunits catalysing the two activities. *Eur J Biochem.* 71(2):327-36.
- Goncharoff P, Nichols BP. 1984. Nucleotide sequence of *Escherichia coli pabB* indicates a common evolutionary origin of p-aminobenzoate synthetase and anthranilate synthetase. *J. Bacteriol.* 159 : 57-62.
- Gosset G, Yong-Xiao J, Berry A. 1996. A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* 17: 47-52.
- Gowrishankar J, Pittard J. 1982. Regulation of phenylalanine biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: control of transcription of the *pheA* operon. *J Bacteriol.* 150(3):1130-7.
- Green JM, WK Merkel, BP Nichols. 1992. Characterization and sequence of *Escherichia coli pabC*, the gene encoding aminodeoxichorismato lyase, a pyridoxal phosphate containing enzyme. *J. Bacteriol.* 174 : 5317-23.
- Hagino H, Nakayama K. 1973. L-tyrosine production by analog-resistant mutants derived from a phenylalanine auxotroph of *Corynebacterium glutamicum*. *Agr Biol Chem* 37: 2013-2023.
- Herrmann KM, Weaver LM. 1999. The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 50:473-503.

- Holms WH. 1986. The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Curr Top Cell Regul.* 28:69-105.
- Ikeda M, Katsumata R. 1992. Metabolic engineering to produce tyrosine or phenylalanine in a tryptophan-producing *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl Environ Microbiol* 58: 781-785.
- Im SW, Pittard J. 1971. Phenylalanine biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: mutants derepressed for chorismate mutase P-prephenate dehydratase. *J Bacteriol.*106(3):784-90.
- Ito H, Sato K, Enei H, Hirose Y. 1990. Improvement in microbial production of L-tyrosine by gene dosage effect of *aroL* gene encoding shikimate kinase. *Agre Biol Chem.* 54.
- Joern, JM. 2003. DNA Shuffling. *Methods Mol Biol.* 231: 85-89.
- Kambourakis S, Frost JW. 2000. Synthesis of gallic acid: Cu(2+)-mediated oxidation of 3-dehydroshikimic acid. *J Org Chem.* 65(21):6904-9.
- Kaplan JB, BP Nichols. 1983. Nucleotide sequence of *Escherichia coli pabA* and its evolutionary relationship to *trp(G)D*. *J. Biol. Mol.* 168 : 451-68.
- Katsumata R, Ikeda M. 1993. Hyperproduction of triptophan in *Corynebacterium glutamicum* by pathway engineering. *Bio/technology.* 11, 921-925.
- Keeling, PJ, Palmer JD, Donald RGK, Roost DS, Waller RF, MacFadden GI. 1999. Shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature* 397:219-220.
- Ki K, Frost JW. 1998. Synthesis de vanillin from glucose. *J Am Chem Soc* 120: 10545-10546.
- Kikuchi Y, Tsujimoto K, Kurahashi O. 1997. Mutational analysis of the feedback sites of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-*arabino*-heptulosonate 7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 63(2):761-2.
- Kishore GM, Shah DM. 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu Rev Biochem.* 57:627-63.
- Koebmann BJ, Westerhoff HV, Snoep JL, Nilsson D, Jensen PR. 2002 (a). The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J Bacteriol.* 184(14):3909-16.

- Koebmann BJ, Westerhoff HV, Snoep JL, Solem C, Pedersen MB, Nilsson D, Michelsen O, Jensen PR. 2002 (b). The extent to which ATP demand controls the glycolytic flux depends strongly on the organism and conditions for growth. *Mol Biol Rep.*29(1-2): 41-5.
- Koh BT, Nakashimada U, Pfeiffer M. 1992. Comparison of acetate inhibition on growth of host and recombinant *E. coli* K12 strains. *Biotech. Letters* 14, 1115-1118.
- Krämer R. 1996. Genetic and physiological approaches for the production of amino acids. *J Biotech* 45: 1-21.
- LaDuca R, Berry A, Chotani G, Dodge T, Gosset G, Valle F, Liao JC, Yong-Xiao J, Power S. 1999. Metabolic pathway engineering of aromatic compounds. In "Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology" (A. L Demain and JE Davies, Eds.) pp. 605-615. Am. Soc Microbiol, Washington DC.
- Li K, Mikola MR, Draths KM, Worden RM, Frost JW. 1999. Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 64: 62-73.
- Li K, Mikola MR, Draths KM, Worden RM, Frost JW. 1999. Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 64(1):61-73.
- Liao JC, Hou S-Y, Chao Y-P. 1996. Pathway analysis, engineering and physiological considerations for redirecting central metabolism. *Biotechnol Bioeng.* 52: 129-140.
- Lischke HHL, Brandes L, Wu X, Schügerl, K. 1993. Influence of acetate on the growth of recombinant *Escherichia coli* JM103 and product formation. *Bioprocess Engineering.* 9, 155-157.
- Lu JL , Liao, 1997. Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: role of transaldolase. *Biotechnol Bioeng* 53: 132-138.
- Miller JE, Backman KC, O'Connor MJ, Hatch RT. 1987. Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* 2: 143-149.
- Murata T, Horinouchi D Beppu T. 1993. Production of poly (L-aspartyl-L-phenilalanine) in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 28: 301-312.
- Murdock D, Ensley BD, Sedar C, Thalen M. 1993. Construction of metabolic operons catalyzing de novo biosynthesis of indigo in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 11: 381-86.

- Murdock D, Ensley BD, Serdar C, Thalen M. 1993. Construction of metabolic operons catalyzing the de novo biosynthesis of indigo in *Escherichia coli*. *Biotechnol* 11: 381-6.
- Nelms J, Edwards RM, Warwick J, Fotheringham I. 1992. Novel mutations in the *pheA* gene of *Escherichia coli* K-12 which result in highly feedback inhibition-resistant variants of chorismate mutase/prephenate dehydratase. *Appl Environ Microbiol*. 58(8): 2592-8.
- Neylon C. 2004. Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic Acids Res*. 32(4):1448-59.
- Niu W, Draths KM, Frost JW. 2002. Benzene-free synthesis of adipic acid. *Biotechnol Prog*. 18(2):201-11.
- Oyama K, Irino S, Hagi N. 1987. Production of aspartame by immobilized thermoase. *Methods Enzymol* 136: 503-17.
- Patnaik R, Liao JC. 1994. Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. *Appl Environ Microbiol*. 60:3903-8.
- Patnaik R, RG Spitzer, JC Liao. 1995. Pathway engineering for production of the aromatics in *Escherichia coli*: Confirmation of stoichiometric Analysis by independent modulation of AroG, TktA and Pps Activities. *Biotechnol. and Bioeng*. 46 : 361-370.
- Patten PA, Howard RJ, Stemmer WP. 1997 . Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Curr Opin Biotechnol*. 8(6):724-33.
- Pietsch H. 1976. Synthese von S-Aspartyl-S-Phenylalaninmethylester (ASPARTAM) aus S-4-Vinylazetidid-2-On. *Tetrahedron Lett*. 45: 4053-4056.
- Pittard A.J. 1996. Biosynthesis of aromatic amino acids. In "*Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology". (FC Neidhardt, R Curtiss III, JL Ingraham, ECC Lin, KB Low, B Magasanik, WS Reznikoff, M Riley, M Schaechter and HE Umbarger, Eds.), pp 458-484, Am Soc Microbiol, Washington DC.
- Pohnert G, Zhang S, Husain A, Wilson DB, Ganem B. 1999 Regulation of phenylalanine biosynthesis. Studies on the mechanism of phenylalanine binding and feedback inhibition in the *Escherichia coli* P-protein. *Biochemistry*. 38(38):12212-7.
- Postma PW, JW Lengeler and GR Jacobson. 1987. Phosphoenolpyruvate : Carbohydrate Phosphotransferase Systems. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular

- and Molecular Biology, Vol. 2 (Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik V, Schaechter and HE Umbarger, eds), pp 1149-1165, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Priefert H, Rabenhorst J, Steinbuchel A. 2001. Biotechnological production of vanillin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56(3-4):296-314.
- Ran N, Knop DR, Draths KM, Frost JW. 2001. Benzene-free synthesis of hydroquinone. *J Am Chem Soc.* 123(44): 10927-34.
- Ray JM, Yanofsky C, Bauerle R. 1988. Mutational analysis of the catalytic and feedback sites of the tryptophan-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170: 5500-5506.
- Richman JE, Chang Y-C, Kambourakis S, Draths KM, Almy E, Snell KD, Strasburg GM, Frost JW. 1996. Reaction of 3-dehydroshikimic acid with molecular oxygen and hydrogen peroxide: products mechanism and associated antioxidant activity. *J Am Chem Soc.* 118: 11587-11591.
- Rose JK, Yanofsky C. 1972. Metabolic regulation of the tryptophan operon of *Escherichia coli*: repressor independent regulation of transcription initiation frequency. *J Mol Biol.* 69: 103-118.
- Sabnis NA, Yang H, Romeo T. 1995. Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. *J Biol Chem* 270: 29096-29104.
- Sato K, Aoki M, Noyori RA. 1998. "Green" route to adipic acid: direct oxidation of cyclohexenes with 30 percent hydrogen peroxide. *Science* 28:1646-7.
- Shumilin IA, Kretsinger RH, Bauerle RH. Crystal structure of phenylalanine-regulated 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Structure Fold Des.* 1999 Jul 15;7(7):865-75.
- Sigüenza R, Flores N, Hernández G, Martínez A, Bolívar F, Valle F. 1999. Kinetic characterization in batch and continuous culture of *Escherichia coli* mutants affected in phosphoenolpyruvate metabolism: differences in acetic acid production. *W J Microbiol Biotech* 15: 587-592.
- Srinivasan P.R., Sprinson D.V. 1959. 2-keto-3-deoxy-D-arabo-heptonic acid 7 phosphate synthase. *J Biol Chem* 234: 716-722.

- Somogyi LP. 1996. The flavor and fragrance industry: serving a global market. *Chem Ind* (4 March):170-173.
- Spiers PA, Sabounjian L, Reiner A, Myers DK, Wurtman J, Schomer D. 1998. Aspartame: neuropsychologic and neurophysiologic evaluation of acute and chronic effects. *Am J Clin Nutr.* 68: 531-7.
- Stemmer WP. 1994a. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(22):10747-51.
- Stemmer WP. 1994b. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature.* 370(6488): 389-91.
- Stephanopoulos G and AJ Sinskey. 1993. Review. Metabolic engineering methodologies and future prospects. *Trends Biotechnol.* 11, 392-396.
- Stephanopoulos G and JJ Vallino. 1991. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science* 252 : 1675-1681.
- Stephanopoulos G. 1998. Metabolic engineering. *Biotechnol. and Bioeng.* 58 : 119-120.
- Stephanopoulos G. 1999. Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic Engineering* 1 : 1-11.
- Tao H, Cornish VW. 2002. Milestones in directed evolution. *Curr. Opin Chem Biol.* 6, 858-864.
- Tatarko M, Romeo T. 2001. Disruption of a global regulatory gene to enhance central carbon flux into phenylalanine biosynthesis in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 43: 26-32.
- Taylor SV, Kast P, Hilvert D. 2001. Investigating and engineering enzymes by genetic selection. *Angew Chem Int Ed Engl,* 40, 3310-3335.
- Tribe DE, Camakaris H, Pittard J. 1976. Constitutive and repressive enzymes of the common pathway of aromatic biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. Regulation of enzyme synthesis at different growth rates. *J. Bacteriol.* 127, 1085-1097.
- Valle F, Muñoz E, Ponce E, Flores N, Bolívar F. 1996. Basic and applied aspects of metabolic diversity: the phosphoenolpyruvate node. *J Ind Microbiol.* 17: 458-462.
- Walton NJ, Narbad A, Faulds C, Williamson G. 2000. Novel approaches to the biosynthesis of vanillin. *Curr Opin Biotechnol.* 11(5):490-6.

- Wang C, Oh MK, Liao JC. 2000. Directed evolution of metabolically engineered *Escherichia coli* for carotenoid production. *Biotechnol Prog.* 16(6):922-6.
- Weikert C, Sauer U, Bailey JE. 1998. Increased phenylalanine production by growing and non-growing *Escherichia coli* strain CWML2. *Biotechnol Prog* 14: 420-424.
- Yi J, Draths KM, Li K, Frost JW. 2003. Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol Prog* 19:1450-9.
- Yi J, Li K, Draths KM, Frost JW. 2002. Modulation of phosphoenolpyruvate synthase expression increases shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol Prog.* 18(6):1141-8.
- Zhang S, Pohnert G, Kongsaree P, Wilson DB, Clardy J, Ganem B. 1998. Chorismate mutase-prephenate dehydratase from *Escherichia coli*. Study of catalytic and regulatory domains using genetically engineered proteins. *J Biol Chem.* 273(11): 6248-5.
- Zhao J, Shimizu K. 2003. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* K12 grown on ¹³C-labeled acetate and glucose using GC-MS and powerful flux calculation method. *J Biotechnol.* 101(2):101-17.
- Zurawski G, Brown K, Killingly D, Yanofsky C. 1978. Nucleotide sequence of the leader region of the phenylalanine operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(9):4271-5.

Metabolic Engineering and Protein Directed Evolution Increase the Yield of L-Phenylalanine Synthesized From Glucose in *Escherichia coli*

José Luis Báez-Viveros, Joel Osuna, Georgina Hernández-Chávez, Xavier Soberón, Francisco Bolívar, Guillermo Gosset

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal 510-3. Cuernavaca, Morelos 62250, México; telephone: 52-777-3291648; fax: 52-777-3172388; e-mail: gosset@ibt.unam.mx

Received 13 November 2003; accepted 23 March 2004

Published online 26 July 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/bit.20159

Abstract: L-phenylalanine (L-Phe) is an aromatic amino acid with diverse commercial applications. Technologies for industrial microbial synthesis of L-Phe using glucose as a starting raw material currently achieve a relatively low conversion yield ($Y_{Phe/Glc}$). The purpose of this work was to study the effect of PTS (phosphotransferase transport system) inactivation and overexpression of different versions of feedback inhibition resistant chorismate mutase-prephenate dehydratase (CM-PDT) on the $Y_{Phe/Glc}$ and productivity of L-Phe synthesized from glucose. The *E. coli* JM101 strain and its mutant derivative PB12 (PTS⁻Glc⁺ phenotype) were used as hosts. PB12 has an inactive PTS, but is capable of transporting and phosphorylating glucose by using an alternative system constituted by galactose permease (GalP) and glucokinase activities (GlcK). JM101 and PB12 were transformed with three plasmids, harboring genes that encode for a feedback inhibition resistant DAHP synthase (*aroG*^{fbr}), transketolase (*tktA*) and either a truncated CM-PDT (*pheA*^{fbr}) or its derived evolved genes (*pheA*^{ev1} or *pheA*^{ev2}). Resting-cells experiments with these engineered strains showed that JM101 and PB12 strains expressing either *pheA*^{ev1} or *pheA*^{ev2} genes produced L-Phe from glucose with $Y_{Phe/Glc}$ of 0.21 and 0.33 g/g, corresponding to 38 and 60% of the maximum theoretical yield (0.55 g/g), respectively. In addition, in both engineered strains the q_{Phe} reached high levels of 40 mg/g-dcw·h. The metabolic engineering strategy followed in this work, including a strain with an inactive PTS, resulted in a positive impact over the $Y_{Phe/Glc}$, enhancing it nearly 57% compared with its PTS⁺ counterpart. This is the first report wherein PTS inactivation was a successful strategy to improve the $Y_{Phe/Glc}$. © 2004 Wiley Periodicals, Inc.

Keywords: *Escherichia coli*; phosphotransferase transport system (PTS); L-Phenylalanine production; metabolic engineering; DAHP synthase; transketolase; chorismate mutase-prephenate dehydratase

INTRODUCTION

Aromatic amino acids are important examples of chemical products that can be produced by microorganisms using renewable raw materials such as D-glucose. Of particular interest is L-phenylalanine production (L-Phe), since this compound has many applications in the food and pharmaceutical industries. The market volume of L-Phe ascends to ~11,000 metric tons per annum. This amino acid is mainly used as a nutritional supplement and as a precursor for the synthesis of food additives and pharmaceuticals (Bongaerts et al., 2001). Considering the size of its market, aspartame (L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester) is the most important compound having L-Phe as a precursor. Nowadays, aspartame is the most widely used low-calorie sweetener, with an estimated world market of USD \$1.5 billion.

The chemical synthesis of L-Phe has clear disadvantages when compared with the biosynthesis using recombinant microorganisms; for instance, chemical synthesis employs nonrenewable toxic raw materials and generates racemic mixtures of D and L Phe isomers, which complicate the purification processes (Frost and Lievens, 1994). In contrast, the biocatalytic synthesis of L-Phe constitutes an attractive alternative since it is a clean technology that uses renewable resources such as simple carbohydrates (D-glucose), generating less environmental pollution. Nevertheless, the challenge to overcome in the biochemical processes is to improve the modest yield coefficient (conversion efficiency of product/substrate) and productivities of current technologies (Patnaik et al., 1995; Berry, 1996).

Figure 1 shows a simplified metabolic map of the *Escherichia coli* central metabolism including the main intermediates and direct precursors involved in aromatic amino acid biosynthesis: phosphoenolpyruvate (PEP) and erythrose 4-phosphate (EP4). Among the constraints limiting the capacity of *E. coli* for producing high levels of L-Phe are the highly controlled regulation on genes and

Correspondence to: Guillermo Gosset

Contract grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT); CONACyT and UNAM (fellowships to J.L.B.V)

Contract grant number: NC-230

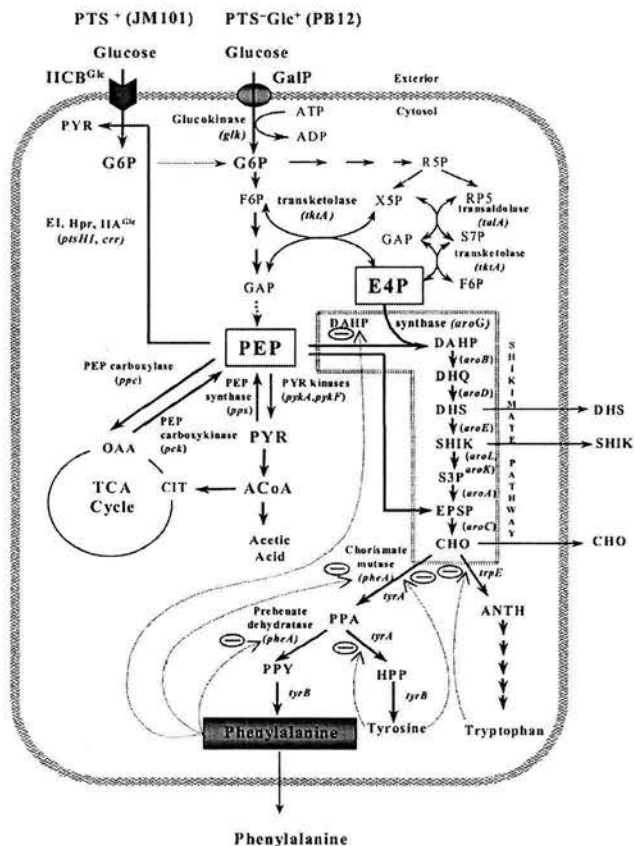


Figure 1. Metabolic network related to L-Phe biosynthesis in *E. coli*, showing the systems used to transport and phosphorylate the glucose in *E. coli* wildtype and in PTS⁻Glc⁺ mutant strain. The central metabolic pathways leading direct precursors PEP and E4P into the SHIK pathway (surrounded by a double dashed line) are also shown. The SHIK pathway consists of seven enzymatic steps catalyzing the conversion from PEP and E4P through chorismate (CHO); at this branch point the carbon flux is distributed through the terminal aromatic pathways. Some enzymatic points subjected to feedback inhibition by product (arrows with dashed lines). Metabolites symbols: G6P, glucose 6-phosphate; F6P, fructose 6-phosphate; GAP, glyceraldehyde 3-phosphate; R5P, ribulose 5-phosphate; R5P, ribose 5-phosphate; X5P, xylulose 5-phosphate; S7P, sedoheptulose 7-phosphate; PYR, pyruvate; PEP, phosphoenolpyruvate; E4P, erythrose 4-phosphate; DAHP, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate; DHQ, 3-dehydroquininate; DHS, 3-dehydroshikimate; SHIK, shikimate; EPSP, 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate; CHO, chorismate; PPA, prephenate; PPY, phenylpyruvate; Phe, phenylalanine; Tyr, tyrosine; Trp, tryptophan; OAA, oxaloacetate; CIT, citrate; ACoA, acetyl coenzyme A. Protein and gene symbols: PTS, phosphotransferase transport system; GalP, galactose permease; *glk*, glucokinase; *ptsHI*, *crr*, PTS general proteins and enzyme IIA^{Glc}, respectively; *talA*, transaldolase; *tktA*, transketolase; *aroG*, DAHP synthase; *aroB*, DHQ synthase; *aroD*, DHQ dehydratase; *aroE*, SHIK dehydrogenase; *aroL*, *aroK*, SHIK kinase; *aroA*, EPSP synthase; *aroC*, CHO synthase; *pheA*, chorismate mutase-prephenate dehydratase.

enzymes of the shikimate (SHIK) and L-Phe pathways (Pittard, 1996). *Escherichia coli* has three 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP) synthase isozymes that catalyze the first reaction of the SHIK pathway, condensing PEP and EP4 into DAHP (Fig. 1). These DAHP synthases, encoded by each of three paralog genes *aroF*, *aroG*, and *aroH* are subject to transcriptional and allosteric control by tyrosine, phenylalanine, and tryptophan, respec-

tively. In the L-Phe biosynthetic pathway, the chorismate mutase-prephenate dehydratase enzyme (CM-PDT) catalyzes the conversion of chorismate (CHO) to prephenate (PPA), and from PPA to phenylpyruvate (PPY), it is subject to feedback inhibition mediated by allosteric binding of L-Phe (Fig. 1). CM-PDT is encoded by the *pheA* gene, which is subject to regulation by both operator-mediated repression and attenuation (Fig. 2). (Gowrishankar and Pittard, 1982; Im and Pittard, 1971; Zurawski et al., 1978).

Several approaches have been studied in order to improve the capacity of microorganisms for channeling carbon flux into the biosynthesis of L-Phe. The essential strategy requires both transcriptional derepression and the relief of feedback inhibition of DAHP synthase and CM-PDT activities. Transcriptional deregulation is relatively simple to achieve by replacing the native DNA regulatory regions with other inducible promoters. In contrast, the generation of feedback inhibition resistant enzymes is not a trivial task since it usually requires the screening of a large

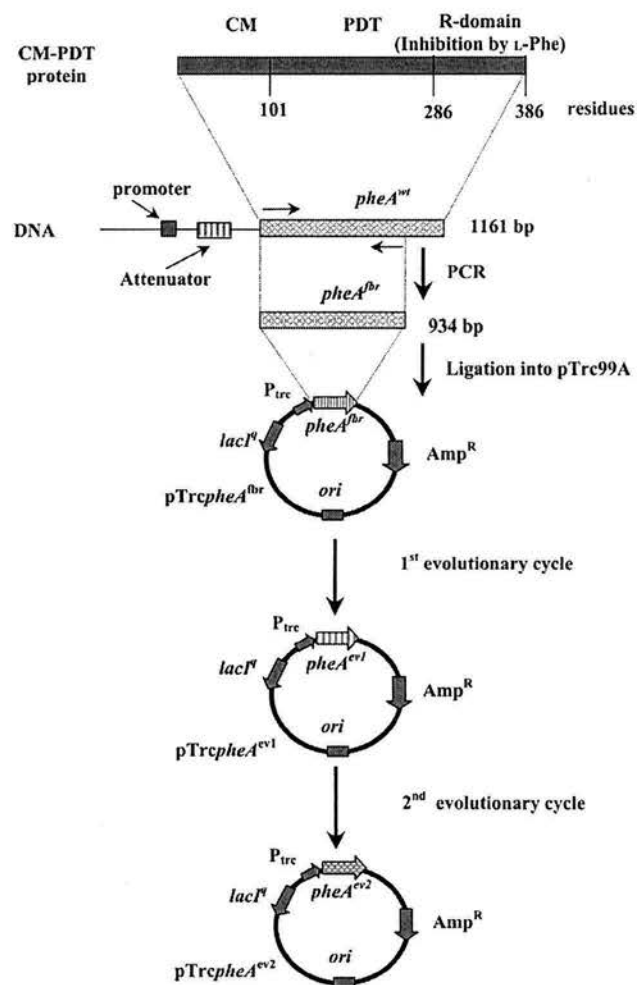


Figure 2. Schematic representation of the protein directed evolution strategy for the generation of feedback inhibition resistant CM-PDT, showing the regions comprising different functional domains of P-Protein (CM, PDT and R-domain) and the wildtype regulatory regions of *pheA* gene.

number of candidates in order to find one with the desired properties. Once the regulation constraints have been eliminated, a new metabolic situation can be created, where the carbon flux supplied by central metabolism could become limiting. In this fashion, different genetic strategies have been reported that increased the availability of direct precursors for aromatic amino acids biosynthesis. In the case of E4P, its availability can be increased by the overexpression of key enzymes of the pentose phosphate pathway such as transketolase (*tkt*) (Draths et al., 1992) or transaldolase (*tal*) (Lu and Liao, 1997). On the other hand, the strategy for augmenting PEP availability includes the overexpression of key enzymes that produce this metabolite such as PEP synthase (*pps*) (Patnaik et al., 1994) or the inactivation of enzymes that consume it, such as PEP carboxylase (*ppc*) (Miller et al., 1987), pyruvate kinases (*pykA*, *pykF*) (Ponce et al., 1995; Gosset et al., 1996), transport systems like the phosphotransferase transport system (PTS) (Flores et al., 1996; Gosset et al., 1996; Chen et al., 1997, Yi et al., 2003; Chandran et al., 2003), or combined approaches like the inactivation of PTS, *pykA* and *pykF* in a single strain (Gosset et al., 1996).

According to the work of Flores et al. (2002) about relative carbon flux distribution (referred as molar percentages of glucose uptake) at the PEP node in wildtype *E. coli*, PTS is the largest consumer of PEP (100%), followed by PYR kinases (40.7%) and PEP carboxylase (24.9%). In contrast to these high relative carbon fluxes, the relative carbon flux directed to aromatic amino acid biosynthesis is around 1.5%. This carbon flux distribution indicates that any inactivation of the main PEP consumer reactions (PTS, Ppc, PykA, and PykF) would have a positive effect on PEP availability. However, PTS inactivation suggests the major positive impact on PEP availability, and therefore on the yield of aromatics compounds. Accordingly, our group has placed emphasis on the development of *E. coli* mutants devoid of PTS (PTS⁻Glc⁺ phenotype). These mutants have been selected by means of a continuous culture for their capacity of growing rapidly using glucose as sole carbon source. In these mutants, the glucose is transported and phosphorylated by an alternative transport system: galactose permease (GalP) and glucokinase (GlcK), which uses ATP as phosphate donor instead of PEP (Fig. 1) (Flores et al., 1996, 2002). In this context, it has been demonstrated that PTS⁻Glc⁺ mutants, expressing simultaneously *aroG*^{fbr} and *tktA* genes, are capable of channeling high carbon fluxes into the shikimate pathway, showing significant increases in the yield of aromatic intermediates synthesized from glucose (Gosset et al., 1996; Báez et al., 2001, Yi et al., 2003; Chandran et al., 2003).

The aim of the present work was to study the effect of PTS inactivation and the overexpression of different versions of feedback inhibition resistant CM-PDT on the L-Phe yield ($Y_{Phe/Glc}$) and specific productivity in *E. coli* strains, which were engineered for high-level aromatics production (transketolase and feedback inhibition resistant DAHP synthase overexpression). Measurement of L-Phe

and intermediates of the SHIK pathway, produced under resting cell conditions, enabled the identification of rate-limiting steps and the effect of different strain genotypes on L-Phe production.

MATERIALS AND METHODS

Strains and Plasmids

All strains and plasmids used in this study are described in Table I. *Escherichia coli* JM101 is the parental strain of PB11 mutant in which the PTS operon (*ptsHI*, *crr*) has been deleted. The PB12 mutant was selected from PB11 strain as a PTS⁻Glc⁺ phenotypic revertant in continuous culture for the ability to grow fast consuming glucose (Flores et al., 1996).

The plasmid pJLBaroG^{fbr} was constructed by ligating a 6.4 kb fragment containing the *aroG*^{fbr} gene that was derived from the double digestion of pRW300 (Gosset et al., 1996) with *Dra* I and *Bst*Z17 I with the 1.1 kb fragment originated from the double digestion of pACYC184 with *Eco*R V and *Pvu* II. The ligation mixture was used to transform by electroporation the AB3248 strain, which is a triple mutant in DAHP synthases. The transformed AB3248 cells were washed twice in isotonic solution (NaCl 0.9%) and selected by functional complementation in plates of aro-media containing tetracycline (30 µg/ml). A 7.5 kb plasmid was verified by restriction patterns for its correct construction and designated pJLBaroG^{fbr}. This plasmid harbors the *aroG*^{fbr} gene, which encodes for a feedback resistant DAHP synthase under the control of *lacUV5* promoter. The plasmid pCL*tk*t contains the gene encoding for transketolase A and was described by Draths et al. (1992). JM101 and PB12 strains were transformed with the plasmids pJLBaroG^{fbr} and pCL*tk*t and selected in LB plates containing proper antibiotics (tetracycline, 30 µg/ml; spectinomycin, 30 µg/ml). Subsequently, these strains were transformed either with pTrc*pheA*^{fbr}, pTrc*pheA*^{ev1}, or pTrc*pheA*^{ev2} and selected in LB plates (containing ampicillin, 200 µg/ml tetracycline, 30 µg/ml; spectinomycin, 30 µg/ml).

Generation of Feedback Inhibition Resistant Versions of the CM-PDT Protein

A truncated CM-PDT was constructed by deleting a region of *pheA* gene encoding amino acid residues 304–386 of the R-domain. This deletion was generated by PCR techniques, using chromosomal DNA of *E. coli* K-12 as template and the following specific oligonucleotides: the direct primer 5' CAACACCATGGCATCGGAAAAC 3' containing a *Nco* I site and the reverse primer 5' CCCAAGCTTTCCGGCACCTTTTCATCAG 3' containing a *Hind* III site. Subsequently, the PCR product *pheA*^{fbr} was cloned into the vector pTrc99A under the control of the *trc* promoter to

Table I. Plasmids, strains and engineered strains used in this study.

Strains	Relevant features	References
JM101	<i>supE</i> , <i>thi</i> , $\Delta(lac-proAB)$, F'	Bolívar et al., 1977
PB12	As JM101 but <i>ptsHI</i> ⁻ , <i>crr</i> ⁻ and Glc ⁺	Flores et al., 1996
AB3248	<i>aroF363 aroG365 aroH367 proA2 argE3 elv-7 his-4 lac gal-2 tsx-358 thi</i>	Wallace and Pittard, 1967
Plasmids		
pRW300	<i>aroG</i> ^{fbr} under the control of <i>lacUV5</i> promoter, <i>lacI</i> ^q and <i>tet</i> genes. Replication origin from pBR322.	Bolívar et al., 1977 Gosset et al., 1996
pCL <i>tkt</i>	<i>tktA</i> (comes from replicon pCL1920, resistant to streptomycin or spectinomycin).	Draths et al., 1992
pACYC184	Tc ^R , Cm ^R , cloning vector.	Rose, 1988
pJL <i>BaroG</i> ^{fbr}	<i>aroG</i> ^{fbr} under the control of <i>lacUV5</i> promoter, <i>lacI</i> ^q and <i>tet</i> genes. Replication origin from pACYC184.	This work
pTrc99A	Cloning vector under <i>lacUV5</i> promoter, carries <i>bla</i> (Ap ^R) and <i>lacI</i> ^q genes. Replication origin from pBR322.	Amann et al., 1988
pTrc <i>pheA</i> ^{fbr}	Truncated <i>pheA</i> ^{fbr} under the control of <i>trc</i> promoter. Fbr superscript means feedback resistant.	This work
pTrc <i>pheA</i> ^{ev1}	Evolved <i>pheA</i> ^{ev1} under the control of <i>lacUV5</i> promoter. Ev1 superscript means 1st version of evolved <i>pheA</i> ^{fbr} gene.	This work
pTrc <i>pheA</i> ^{ev2}	Evolved <i>pheA</i> ^{ev2} under the control of <i>lacUV5</i> promoter. Ev2 superscript means 2nd version of evolved <i>pheA</i> ^{fbr} gene.	This work
Engineered strains		
JM101-fbr	JM101 transformed with pJL <i>BaroG</i> ^{fbr} , pCL <i>tkt</i> and pTrc <i>pheA</i> ^{fbr}	This work
JM101-ev1	JM101 transformed with pJL <i>BaroG</i> ^{fbr} , pCL <i>tkt</i> and pTrc <i>pheA</i> ^{ev1}	This work
JM101-ev2	JM101 transformed with pJL <i>BaroG</i> ^{fbr} , pCL <i>tkt</i> and pTrc <i>pheA</i> ^{ev2}	This work
PB12-fbr	PB12 transformed with pJL <i>BaroG</i> ^{fbr} , pCL <i>tkt</i> and pTrc <i>pheA</i> ^{fbr}	This work
PB12-ev1	PB12 transformed with pJL <i>BaroG</i> ^{fbr} , pCL <i>tkt</i> and pTrc <i>pheA</i> ^{ev1}	This work
PB12-ev2	PB12 transformed with pJL <i>BaroG</i> ^{fbr} , pCL <i>tkt</i> and pTrc <i>pheA</i> ^{ev2}	This work

generate the plasmid pTrc*pheA*^{fbr} (Fig. 2). Thus, the resulting *pheA*^{fbr} gene encodes for a truncated CM-PDT^{fbr} of 303 amino acids, which is similar in size to the mutant *pheA* gene (P*300) previously reported by Zhang et al. (1998). Biochemical analyses of the *E. coli* CM-PDT have established that it contains three distinct domains: CM (residues 1–109), PDT (residues 101–285), and allosteric R-domain (residues 286–386) for feedback inhibition by phenylalanine (Fig. 2). Moreover, it was also reported that the removal of R-domain in a mutant that lacks residues 286–386 (P*300), eliminated the feedback inhibition by phenylalanine and retained CM-PDT activities (Zhang et al., 1998). However, the truncation of R-domain in P*300 mutant decreased the affinity of CM for chorismate and of PDT for prephenate, resulting in a decrease in the catalytic efficiency (K_{cat}/K_m) of 3-fold for CM and 1.7-fold for PDT. As a strategy for reverting these deleterious effects on the catalytic parameters, we decided to carry out protein evolution of the CM-PDT^{fbr} according to the method described by Stemmer (1994). Two evolutionary cycles were performed to select the two mutant genes (*pheA*^{ev1} and *pheA*^{ev2}) by their ability to restore growth of an *E. coli* mutant (*pheA*⁻, *tyrA*⁻). These evolved genes were cloned into pTrc99A to generate plasmids pTrc*pheA*^{ev1} and pTrc*pheA*^{ev2} (Fig. 2). The DNA sequences of evolved *pheA*^{ev1} and *pheA*^{ev2} genes were determined. The variant *pheA*^{ev1} gene did not present mutations in the CM domain, while in the PDT domain two amino acid substitutions were found: Thr259Ser and Tyr230Leu. On the other hand, in the variant *pheA*^{ev2} gene, four substitutions within the CM domain were found: Asn5Ser, Leu8Pro, Asp54Asn, and Leu55Met, while in the PDT domain, one substitution was found: Ser235Ala.

Purification and kinetic characterization of these enzymes is currently in progress (unpubl. data).

Generation of Engineered *E. coli* Strains for Increasing Carbon Flux to L-Phe

The host strains used in this study were JM101 (PTS⁺) and its derivative PB12 (PTS⁻Glc⁺). These strains were transformed with plasmids pJL*BaroG*^{fbr} and pCL*tkt*, encoding a feedback inhibition resistant DAHP synthase and transketolase, respectively. Resulting strains were also transformed with either one of three plasmids (pTrc*pheA*^{fbr}, pTrc*pheA*^{ev1}, or pTrc*pheA*^{ev2}), overexpressing different versions of feedback inhibition resistant CM-PDT (see Table I).

Growth Media and Cultivation Conditions

Modified minimal medium M9 was used for the L-Phe production cultures. A system of resting cell cultures was chosen to reduce biomass formation and to enhance L-Phe production. Glucose was used as the sole carbon source in these experiments at a concentration of 10 g/L. The chemical composition of the M9 medium was 211 mM Na₂HPO₄, 42.8 mM NaCl, 110 mM KH₂PO₄, 74.7 mM NH₄Cl, 1 mM MgSO₄, 50 μM CaCl₂ and 0.3 μM vitamin B1, 100 μM IPTG and 1 ml/L of trace elements solution containing 0.1 g/L CaCl₂·2H₂O, 0.02 g/L of CuCl₂·5H₂O, 0.1 g/L of CoCl₂·6H₂O, 0.2 g/L of FeSO₄·7H₂O, 0.1 g/L of MnSO₄·5H₂O, 0.1 g/L of ZnSO₄·7H₂O, and 0.01 g/L of Na₂MoO₄·2H₂O. No antibiotics were used in the resting cells cultures. The pH of the medium was adjusted to 7.0. Aro-media has the same composition of min-

imal media M9 but also contains 2-3 dihydrobenzoic acid (35 mg/l), *p*-hydroxybenzoic acid (48 mg/l) and *p*-aminobenzoic acid (62 mg/l).

Precultivation medium was the same as for the resting cell cultures, but yeast extract was added at a concentration of 5 g/L. All stock cultures were stored at -70°C in Luria-Bertani medium containing 50% of glycerol. Overnight cultures were used as preinoculum and then were subcultured in shake flask containing 50 ml of precultivation medium with the appropriated antibiotics for plasmids maintenance and 100 μM of IPTG for induction of the *aroG^{fbr}* and *pheA* genes. Subsequently, these cells growing in exponential phase were harvested by centrifugation when cells reached an optical density of 2 (600 nm) and washed twice with M9 to be used as inoculum in the resting cell cultures. These metabolically active cells were suspended in baffled shake-flasks containing 50 ml of M9 minimal media with 10 g/L of glucose as sole carbon source. In order to arrest the cellular growth, 50 $\mu\text{g/ml}$ of chloramphenicol was added at the beginning of the culture.

Analytical Methods

Samples were taken periodically from the cultures for determining absorbance at 600 nm using a spectrophotometer (Beckman DU-70, Palo Alto, CA) and the dry cell weight was calculated multiplying the absorbance by a previously determined coefficient factor of 0.45 g/L. The D-glucose, L-Phe, L-tyrosine (Tyr), L-tryptophan (Trp), DAHP, DHS, and SHIK concentrations were determined in an HPLC system (600E quaternary bomb, 717 automatic injector, 2410 refraction index, and 996 photodiode array detectors, Waters, Milford, MA). For determination of D-glucose, DAHP, DHS, SHIK, formic, acetic, propionic, and lactic acids, an Aminex HPX-87H column (300 \times 7.8 mm; 9 μm) (Bio-Rad, Hercules, CA) was used. Running conditions were: mobile phase, 5 mM H_2SO_4 ; flow, 0.5 ml/min, and temperature, 50°C . Under these conditions glucose and acetic acid were detected by refraction index. The other metabolites were identified by photodiode array at 210 nm. For L-Phe, L-Trp, L-Tyr, and CHO determination, a Supelco Discovery C18 column (250 \times 4.6 mm, 5 μm) (Sigma, St. Louis, MO) was used. Running conditions were: mobile phase, 0.2% trifluoroacetic acid in 40% methanol; flow, 0.5 ml/min. Detection was performed by photodiode array at 220 nm for L-Phe and 280 nm for the other metabolites. An alternative method to determine DAHP concentration by the thiobarbituric assay was also used (Srinivasan and Sprinson, 1959).

RESULTS

Resting Cells Experiments for L-Phe Production

The six strains generated JM101-fbr, JM101-ev1, JM101-ev2, PB12-fbr, PB12-ev1, and PB12-ev2 were studied un-

der resting cell conditions (Table I). This experimental condition was selected as it eliminates the consumption of metabolic resources for biomass generation. These cultures were started at an initial biomass concentration of 1 ± 0.1 g/l and this value did not change significantly during the 10-h experiment (Materials and Methods) (Fig. 3A). Samples were taken periodically and supernatants were analyzed by HPLC to determine the concentration of D-glucose, DAHP, DHS, SHIK, CHO, L-Phe, L-Tyr, L-Trp, and organic acids formate, acetate, propionate, and lactate (see Fig. 1). All experiments were performed in duplicate, and the reported values represent the mean values of at least three independent experiments. The difference in measured metabolite concentrations among independent experiments was in the range of 1–10%.

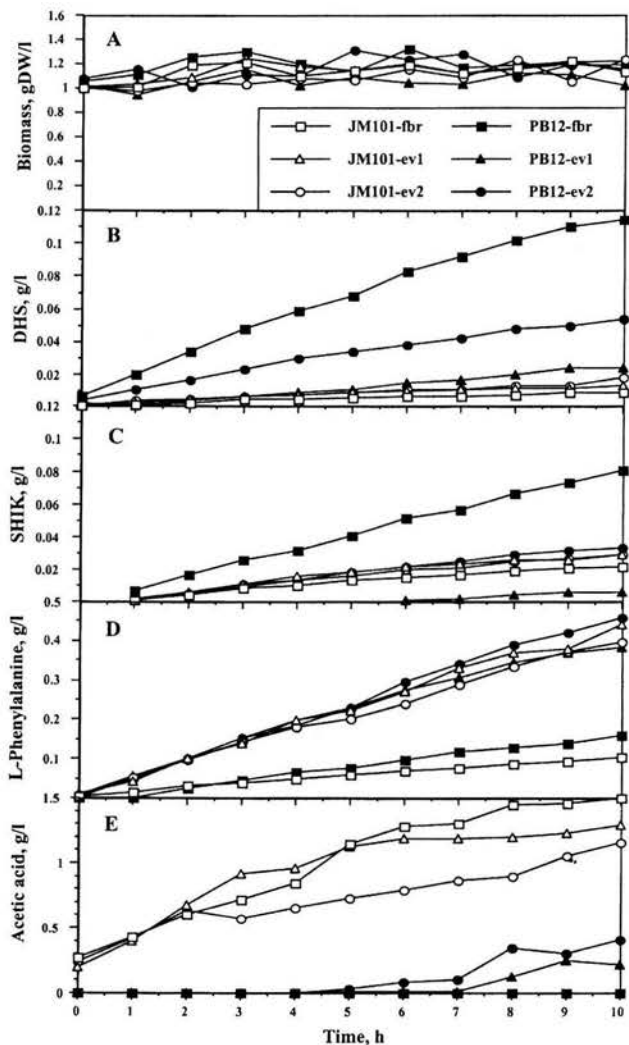


Figure 3. Accumulation of DHS, SHIK, and CHO in the resting cells experiments. Strains are described in Table I. All experiments were performed in duplicate and the reported values represent the mean values of at least three independent experiments. The difference in measured metabolite concentrations among independent experiments was in the range of 1–10%. Biomass (A), L-Phe (B), DHS (C), and SHIK production kinetics (D) determined in shake-flasks of resting cell experiments.

Glucose consumption specific rates (q_{Glc}) were calculated from glucose and biomass concentration data. During the experiment, q_{Glc} values remained constant for all strains (data not shown). The q_{Glc} of all PTS^+ strains was 0.17 ± 0.01 g/gDW*h while PTS^-Glc^+ mutants had lower q_{Glc} ranging from 0.09 ± 0.008 to 0.12 ± 0.01 g/gDW*h (Fig. 4). PTS^-Glc^+ mutants showed a significantly lower glucose uptake rate, corresponding to a 30–47% decrease compared to PTS^+ strains. The glucose transport capacity has been previously measured in PTS^-Glc^+ mutants (Báez et al., 2001; Flores et al., 2002), reporting a 42% decrease, which is in agreement with the observed q_{Glc} reduction.

HPLC analyses for detecting intermediates of the SHIK pathway in supernatants from resting cell experiments, revealed the presence of significant DHS, SHIK, and CHO concentrations. Accumulation of DHS increased linearly during resting cell cultures for all strains (Fig. 3B). The highest concentrations of DHS were observed in the PTS^-Glc^+ genetic background, reaching levels of 0.15 ± 0.01 and 0.054 ± 0.004 g/l by PB12-fbr and PB12-ev2 strains, respectively. On the other hand, SHIK accumulation also linearly increased during these resting-cell experiments (Fig. 3C). Again, the highest level of SHIK accumulation was observed in the PTS^-Glc^+ genetic background (PB12-fbr strain). Finally, the third accumulated intermediate was CHO, which was only detected in the supernatants of strains JM101-fbr and PB12-fbr (Fig. 5).

Concentration of L-Phe in supernatants increased linearly in all strains (Fig. 3D). JM101-fbr and PB12-fbr strains overexpressing $pheA^{fbr}$ accumulated L-Phe concentrations of 0.1 ± 0.009 and 0.16 ± 0.01 g/L, respectively, while the same strains but expressing evolved $pheA^{ev1}$ or $pheA^{ev2}$ reached concentrations 3–4-fold higher. L-Phe production rates and biomass concentrations were used to calculate the L-Phe production specific rate (q_{Phe}) (Fig. 4), which is also designated specific productivity, being one of the most relevant parameters to evaluate the performance of a production strain. Thus, the lowest q_{Phe} were observed in strains expressing $pheA^{fbr}$ (JM101-fbr and PB12-fbr),

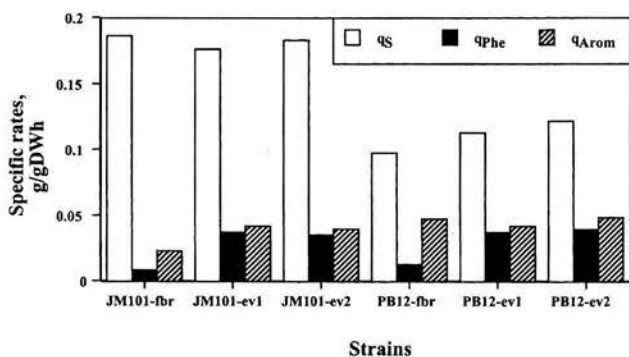


Figure 4. The specific glucose uptake rate q_S (q_{Glc}), the specific L-Phe production rate q_{Phe} and the specific aromatic production rate q_{Arom} (total detected aromatics) calculated in resting cell experiments, reported as $g(gDW \cdot h)^{-1}$.

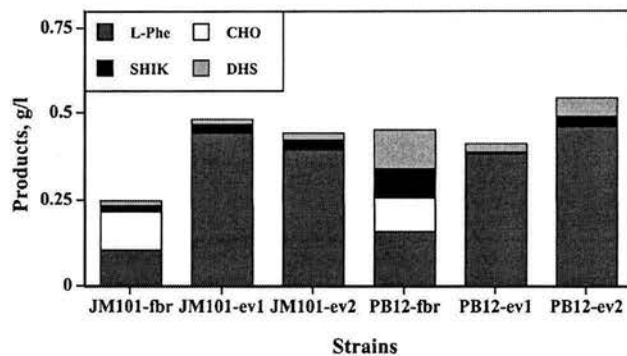


Figure 5. Carbon recovery in the form of aromatic intermediates (DHS, SHIK, and CHO) and product (L-Phe), reported in g/l.

whereas the highest q_{Phe} were achieved by strains JM101-ev1, JM101-ev2, PB12-ev1, and PB12-ev2, reaching a q_{Phe} of 38 ± 1.9 , 36 ± 1.7 , 38 ± 2.3 , and 40.6 ± 3.1 mg/gDW*h, respectively. Accordingly, overexpression of evolved $pheA^{ev1}$ and $pheA^{ev2}$ genes had a positive and significant impact on q_{Phe} , showing a 3–4-fold improvement, when compared with equivalent strains expressing $pheA^{fbr}$. In addition, in Figure 4 it can be observed that all strains expressing evolved $pheA^{ev1}$ and $pheA^{ev2}$ had similar q_{Phe} in both genetic backgrounds (PTS^+ and PTS^-Glc^+). Therefore, the improvement in q_{Phe} due to PTS inactivation could not be appreciated in PB12 mutants because higher carbon fluxes were excreted in the form of aromatic intermediates when compared to JM101 strains.

The only organic acid detected in these experiments was acetate (Fig. 3E). Regardless of which version of $pheA$ was expressed, acetate accumulated to a significant higher level in PTS^+ strains than in their PTS^-Glc^+ derivatives. It has previously been reported that PTS^-Glc^+ mutants excrete lower amounts of acetate when compared to PTS^+ strains (Sigüenza et al., 1999).

Figure 5 shows the main compounds accumulated in resting cell cultures supernatants at the end of the experiment (10 h), allowing to partially visualize the aromatic carbon recovery in the form of intermediates (DHS, SHIK, and CHO) and products (L-Phe), with the latter being the highest compound accumulated in most of engineered strains.

We calculated absolute yields of L-Phe from glucose ($Y_{Phe/Glc}$) by using specific rates data according to the equation: $Y_{Phe/Glc} = q_{Phe}/q_{Glc}$ (Fig. 6). Of all strains, JM101-fbr and PB12-fbr displayed the lowest yields (0.05 ± 0.002 and 0.14 ± 0.017 g/g, respectively). By comparing these two strains, it is evident that the $Y_{Phe/Glc}$ increased significantly in the PTS^-Glc^+ genetic background. These yields were further improved in strains expressing evolved versions of $pheA^{ev1}$ and $pheA^{ev2}$. Thus, in the PTS^+ genetic background JM101-ev1 and JM101-ev2 strains had $Y_{Phe/Glc}$ of 0.21 ± 0.01 and 0.22 ± 0.02 g/g, respectively, while in the PTS^-Glc^+ genetic background, PB12-ev1 and PB12-ev2 strains had the highest $Y_{Phe/Glc}$ of 0.33 ± 0.02 g/g (Fig. 6).

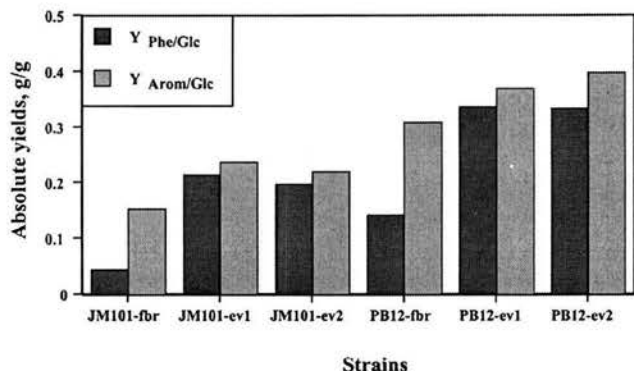


Figure 6. Absolute yields of L-Phe ($Y_{Phe/Glc}$) and total detected aromatics ($Y_{Arom/Glc}$) synthesized from glucose. To calculate $Y_{Arom/Glc}$, amounts of produced DHS, SHIK, CHO, and L-Phe were considered. Yields are reported as $g(g^{-1})$.

Maximum theoretical yield coefficients $^{max}Y_{Phe/Glc}$ have been calculated from the known stoichiometry of L-Phe biosynthesis from glucose in different metabolic scenarios (Förberg et al., 1988; Patnaik et al., 1994). For instance, in wildtype *E. coli*, where the PTS is converting PEP to PYR during glucose transport and PYR is not recycled back to PEP through PEP synthase, the calculated maximum theoretical yield ($^{wt,max}Y_{Phe/Glc}$) is 0.275 g/g. On the other hand, in an engineered strain where either the PTS is inactive or PYR is being recycled back to PEP, the maximum theoretical yield ($^{eng,max}Y_{Phe/Glc}$) could be increased 2-fold to 0.55 g/g. According to these values, JM101-ev1 and JM101-ev2 strains reached yields corresponding to 74% and 77% of the $^{wt,max}Y_{Phe/Glc}$ or 36% and 38% of the $^{eng,max}Y_{Phe/Glc}$, whereas PB12-ev1 and PB12-ev2 strains ($PTS^{-}Glc^{+}$) reached yields that corresponded to 60% of $^{eng,max}Y_{Phe/Glc}$. Consequently, PTS inactivation had a significant positive effect on the $Y_{Phe/Glc}$, since $PTS^{-}Glc^{+}$ mutants showed a 57% increase as compared with PTS^{+} strains. To determine the overexpression effect among $pheA^{fbr}$ mutant gene and its evolved versions $pheA^{ev1}$ and $pheA^{ev2}$ over the $Y_{Phe/Glc}$, we compared the L-Phe production performance of JM101-fbr vs. JM101-ev1 and JM101-ev2 strains. Thus, in the PTS^{+} genetic background, the expression of evolved version $pheA^{ev1}$ and $pheA^{ev2}$ genes improved the $Y_{Phe/Glc}$ ~350%, while in the $PTS^{-}Glc^{+}$ genetic background, by comparing PB12-fbr vs. PB12-ev1 and PB12-ev2 strains, the $Y_{Phe/Glc}$ enhancement corresponded to 130%. Therefore, these results indicated that in addition to the positive effect of the $PTS^{-}Glc^{+}$ background, protein engineering of the CM-PDT (*pheA*) was also a successful approach to strongly enhance the yield of L-Phe from glucose.

The accumulation of aromatic intermediates was observed in all strains, with the highest level detected in the $PTS^{-}Glc^{+}$ strains cultures. In order to evaluate the magnitude of impact caused by intermediate accumulation over the $Y_{Phe/Glc}$, we estimated the global yield for aromatics ($Y_{Arom/Glc}$) by considering in the calculation the amount of aromatic intermediates DHS, SHIK, CHO, and the final

product L-Phe. In Figure 6 we observed that, in $PTS^{-}Glc^{+}$ mutants, $Y_{Arom/Glc}$ were of 0.30 ± 0.02 , 0.37 ± 0.03 , and 0.40 ± 0.03 g/g for the PB12-fbr, PB12-ev1, and PB12-ev2, respectively, while in the PTS^{+} background, $Y_{Arom/Glc}$ were of 0.15 ± 0.01 , 0.23 ± 0.02 , and 0.22 ± 0.02 g/g. By comparing the magnitudes of $Y_{Phe/Glc}$ and $Y_{Arom/Glc}$, we can figure out $Y_{Phe/Glc}$ that could be significantly improved further in all strains by implementing proper genetic strategies to overcome the rate-limiting enzymatic steps.

DISCUSSION

The enzymatic machinery to biosynthesize aromatic amino acids is present in *E. coli*. However, in a wildtype strain, under normal growth conditions the carbon flow directed into the SHIK pathway is relatively very small, corresponding to 1.5% of the glucose uptake rate (Flores et al., 2002). Therefore, in order to improve the potential of *E. coli* as an aromatic amino acid-producing strain, modifications of key metabolic enzymes must be performed. Several approaches for enhancing the conversion efficiency from glucose to L-Phe biosynthesis have been reported in *E. coli*. For instance, Miller et al. (1987) assessed a PEP carboxylase mutant which overexpressed simultaneously *aroF* and *pheA^{fbr}* genes, achieving a $Y_{Phe/Glc}$ of 0.04 g/g, corresponding to 5% of $^{eng,max}Y_{Phe/Glc}$. Förberg et al. (1988) reported $Y_{Phe/Glc}$ of 0.27 g/g corresponding to 50% of $^{eng,max}Y_{Phe/Glc}$ in strains overexpressing *aroF* and *pheA^{fbr}* genes. Weikert et al. (1998) reported $Y_{Phe/Glc}$ of 0.057 g/g in strains coexpressing *aroF^{fbr}* and *pheA^{fbr}* genes. On the other hand, Romeo (1998) found that the disruption of the global regulatory gene *csrA* (carbon storage regulator) enhances central carbon flux directed to L-Phe biosynthesis in strains coexpressing *aroG^{fbr}*, *tktA*, and *pheA^{fbr}*. This fact occurs presumably because the *csrA* gene product negatively regulates PEP synthase (*pps*) and PEP carboxylase (*pckA*) and positively regulates pyruvate kinase F (*pykF*) (Tatarko and Romeo, 2001). In the latter work, $Y_{Phe/Glc}$ of 0.43 g/g was reported using a glucose concentration of 0.5 g/L. However, the $Y_{Phe/Glc}$ decreased to 0.13 g/g when a glucose concentration of 10 g/l was used. Therefore, the high $Y_{Phe/Glc}$ was primarily the consequence of low glucose concentration, more than an effect of the *csrA* mutation.

In several works, the importance of a PTS inactivation strategy for the improvement of yield of aromatic compounds has been evaluated (Gosset et al., 1996; Chen et al., 1997; Báez et al., 2001; Yi et al., 2003; Chandran et al., 2003). Chen et al. (1997) reported the use of a PTS^{-} mutant (PP316) harboring plasmids which coexpress *aroF^{fbr}* and *pheA^{fbr}* in order to overproduce L-Phe. However, contrary to expectation, PP316 produced much less L-Phe than an isogenic PTS^{+} strain. The PP316 strain is similar to PB12, since both possess the same PTS deletion and transport and phosphorylate glucose with GalP and Glk activities. However, both mutants were obtained through different selection methods. In the case of PP316, the gene encoding the

repressor GalR was inactivated and the strain was isolated by selection on glucose minimal plates, whereas the PB12 mutant was isolated as a spontaneous glucose⁺ revertant by means of selection for rapid growth in a continuous culture (Flores et al., 1996). The difference in performance between PP316 and PB12 points to the importance of selection strategies for obtaining efficient production strains. Perhaps the selection pressure during continuous culture favored the isolation of a robust PTS⁻ glucose⁺ mutant for producing aromatic compounds.

In the present work, using the mutant PB12 as host, we constructed an efficient L-Phe producer strain having a combination of increased specific enzymatic activities (*galP*, *glk*, *tktA*, *aroG*^{fbr}, and *pheA*^{ev}). In resting-cell cultures of the PTS⁻Glc⁺ strains producing the parental PheA^{fbr} protein, the high-level accumulation of some aromatic intermediates such as DHS, SHIK, and CHO was detected. Excretion and accumulation of intermediates can be interpreted as evidence that the carbon flux is exceeding the metabolic capacity of some enzymes in the SHIK pathway, thus becoming rate-limiting. At the same time, the accumulated intermediate might cause a feedback inhibition effect on the enzyme that synthesizes it. Therefore, SHIK accumulation could be attributed to rate-limitation of the shikimate kinases isoenzymes (*aroL*, *aroK*). Furthermore, it has been reported that SHIK dehydrogenase (*aroE*) can be feedback-inhibited by SHIK (Dell and Frost, 1993). In consequence, SHIK dehydrogenase inhibition could cause the DHS accumulation. On the other hand, CHO accumulation in strains coexpressing the *pheA*^{fbr} gene suggests an enzymatic rate-limitation of CM-PDT^{fbr}. Accumulation of CHO did not occur when the *pheA*^{ev1} or *pheA*^{ev2} genes were overexpressed. These results strongly suggest a significant improvement in the conversion of CHO to prephenate by the evolved CM-PDT encoded by either *pheA*^{ev1} or *pheA*^{ev2} genes. It was found that DHS and SHIK accumulation was higher in PTS⁻Glc⁺ strains than in the counterpart PTS⁺ strains. This can be explained as a result of a higher PEP availability of PTS⁻Glc⁺ strains, which is reflected as an increase of carbon flux channeled through the SHIK pathway.

The measured specific rates of L-Phe production permitted us to partially determine the carbon flux redistribution at the PEP node when comparing nonengineered strains (JM101 and PB12) with engineered strains generated in this work. For instance, in both JM101 and PB12 strains the relative carbon flux directed into the SHIK pathway was 1.5 and 2% of the glucose uptake rate, respectively (Flores et al., 2002), while in engineered JM101-ev1 and JM101-ev2 strains, it was enhanced significantly to 23.1%. On the other hand, in the PB12-ev1 and PB12-ev2 mutants harboring the same plasmids, the relative carbon flux was further improved at levels of 36.8%. Furthermore, if we take into account intermediate accumulation, the values of relative carbon fluxes directed into the shikimate pathway would increase to 25.8% and 43.5% for JM101-ev1 and PB12-ev2, respectively.

The relative contribution of either *pheA*^{ev} or *pheA*^{fbr} on the yield improvement was quantified by comparing both PTS⁺ and PTS⁻Glc⁺ metabolic scenarios. Thus, we concluded that directed evolution approaches for improving CM-PDT^{fbr} complementation properties was a successful strategy to strongly enhance the yield of L-Phe from glucose. In addition to this fact, CHO was not detected in the cultures of PB12-ev1 and PB12-ev2 strains, which suggests a relevant improvement in the catalytic properties of evolved CM-PDT enzyme versions.

The reached $Y_{Phe/Glc}$ of 0.33 g/g by the PTS⁻Glc⁺ strains (PB12-ev1 or PB12-ev2) is the highest experimental yield coefficient reported under conditions of high glucose concentration (10 g/l). It may be possible to further improve the $Y_{Phe/Glc}$ and q_{Phe} in this strain, as suggested by the higher carbon recovery in the form of aromatic intermediates, which increased the aromatics global yield. The strategies to maximize the carbon flux and to further increase the $Y_{Phe/Glc}$ would imply the overexpression of the rate-limiting enzymes encoded by either *aroL* or *aroK* and the *aroE* gene. In conclusion, we demonstrated the significant positive impact of PTS inactivation in PB12 mutant combined with the simultaneous overexpression of transketolase, feedback-resistant inhibition DAHP synthase, and evolved CM-PDT on $Y_{Phe/Glc}$, enhancing it 1.6-fold when compared with its parental JM101 strain (PTS⁺).

The authors thank Mercedes Enzaldo for technical assistance and the technical service of the Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (Instituto de Biotecnología, UNAM).

References

- Amann E, Ochs B, Abel KJ. 1988. Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69:301–315.
- Báez JL, Bolívar F, Gosset G. 2001. Determination of 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase system. *Biotechnol Bioeng* 73:530–535.
- Berry A. 1996. Review. Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *T Biotech* 14:250–256.
- Bolívar F, Rodríguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heynecker HL, Boyer HW, Crosa JH, Fallow S. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95–113.
- Bongaerts J, Krämer M, Müller U, Raeven L, Wubbolts M. 2001. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metab Eng* 3:289–300.
- Chandran SS, Yi J, Draths KM, Daeniken R, Weber W, Frost JW. 2003. Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnol Prog* 19:808–814.
- Chen R, Hatzimanikatis V, Yap WMGJ, Postma PW, Bailey JE. 1997. Metabolic consequences of phosphotransferase (PTS) mutation in a phenylalanine-producing recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 13:768–775.
- Dell KA, Frost JW. 1993. Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: rate-limiting enzymes in the common pathway of aromatic amino acid biosynthesis. *J Am Chem Soc* 115:11581–11589.
- Draths KM, Pompliano DL, Conley DL, Frost JW, Berry A, Disbrow GL, Staversky RJ, Lievens JC. 1992. Biocatalytic synthesis of aromatic

- from D-glucose: the role of transketolase. *J Am Chem Soc* 114: 3956–3962.
- Flores N, Yong-Xiao J, Berry A, Bolivar F, Valle F. 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 14:620–623.
- Flores S, Gosset G, Flores N, de Graff AA, Bolivar F. 2002. Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ^{13}C labeling and NMR spectroscopy. *Metab Eng* 4:124–137.
- Förberg C, Eliaeson T, Haggström L. 1988. Correlation of theoretical and experimental yields of phenylalanine from non-growing cells of a rec *Escherichia coli* strain. *J Biotechnol* 7:319–332.
- Frost JW, Lievens J. 1994. Prospects for biocatalytic synthesis of aromatics in the 21st century. *J Chem* 18:341–348.
- Gosset G, Yong-Xiao J, Berry A. 1996. A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* 17:47–52.
- Gowrishankar J, Pittard J. 1982. Regulation of phenylalanine biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: control transcription of the *pheA* operon. *J Bacteriol* 150:1130–1137.
- Im SWK, Pittard AJ. 1971. Phenylalanine biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: mutants derepressed for chorismate mutase P-prephenate dehydratases. *J Bacteriol* 106:784–790.
- Lu J, Liao JC. 1997. Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: role of transaldolase. *Biotechnol Bioeng* 53: 132–138.
- Miller JE, Backman KC, O'Connor MJ, Hatch RT. 1987. Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* 2:143–149.
- Patnaik R, Liao JC. 1994. Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic production with near theoretical yield. *Appl Environ Microbiol* 60:3903–3908.
- Patnaik R, Spitzer RG, Liao JC. 1995. Pathway engineering for production of the aromatics in *Escherichia coli*: Confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of AroG, TktA and Pps Activities. *Biotechnol and Bioeng* 46:361–370.
- Pittard AJ. 1996. Biosynthesis of aromatic amino acids. In: Neidhardt FC, Curtiss R III, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE, editors. *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology. Washington, DC: Am Soc Microbiol. p 458–484.
- Ponce E, Flores N, Martínez A, Valle F, Bolívar F. 1995. Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. *J Bacteriol* 177:5719–5722.
- Romeo T. 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA-molecule CsrB. *Mol Microbiol* 29: 1321–1330.
- Rose RE. 1988. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res* 16:355.
- Sigüenza R, Flores N, Hernández G, Martínez A, Bolivar F, Valle F. 1999. Kinetic characterization in batch and continuous culture of *Escherichia coli* mutants affected in phosphoenolpyruvate metabolism: differences in acetic acid production. *W J Microbiol Biotech* 15: 587–592.
- Srinivasan PR, Sprinson DV. 1959. 2-keto-3-deoxy-D-arabo-heptonic acid 7 phosphate synthase. *J Biol Chem* 234:716–722.
- Stemmer WPC. 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370:389–391.
- Tatarko M, Romeo T. 2001. Disruption of a global regulatory gene to enhance central carbon flux into phenylalanine biosynthesis in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 43:26–32.
- Wallace BJ, Pittard J. 1967. Genetic and biochemical analysis of the isozymes concerned in the first reaction of aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 93:234–244.
- Weikert C, Sauer U, Bailey JE. 1998. Increased phenylalanine production by growing and non-growing *Escherichia coli* strain CWML2. *Biotechnol Prog* 14:420–424.
- Yi J, Draths KM, Li K, Frost JW. 2003. Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in, *E. coli*. *Biotechnol Prog* 19: 1450–1459.
- Zhang S, Pohnert G, Kongsaeere P, Wilson DB, Clardy J, Ganem B. 1998. Chorismate mutase-prephenate dehydratase from *Escherichia coli*. Study of catalytic and regulatory domains using genetically engineered proteins. *J Biol Chem* 273:6248–6253.
- Zurawski G, Brown KD, Killingly K, Yanofsky C. 1978. Nucleotide sequence of the leader region of the phenylalanine operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:4271–4275.